Christine Wagner

ENTWICKLUNG EINER NUMERISCH-ADDITIVEN KOMBINATIONSVACCINE GEGEN TETANUS UND VARIOLA

Diss München
1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544309_0021

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr

ENTWICKLUNG EINER NUMERISCH-ADDITIVEN KOMBINATIONSVACCINE GEGEN TETANUS UND VARIOLA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Christine Wagner
aus
München

München 1983

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. G. Terplan

Referent: Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

Tag der Promotion: 29. Juli 1983

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A	EINLEITUNG	1
B	SCHRIFTTUM	3
	Tetanus-Toxoid in numerisch-additiven Kombinationsimpfstoffen	
1.	Kombinationsimpfstoffe mit Tetanus-Toxoid in der Tiermedizin	3
1.1.	Tetanus-Toxoid kombiniert mit anderen Clostridien-Toxoiden	3
1.2.	Tetanus-Toxoid kombiniert mit viralen Antigenen	6
2.	Kombinationsimpfstoffe mit Tetanus-Toxoid in der Humanmedizin	11
2.1.	Tetanus-Toxoid kombiniert mit anderen Clostridien-Toxoiden	11
2.2.	Tetanus-Toxoid kombiniert mit Diphtherie-Toxoid	12
2.3.	Tetanus-Toxoid kombiniert mit Diphtherie- und Staphylokokken-Toxoid	14
2.4.	Tetanus-Toxoid kombiniert mit Toxin/Toxoid und inaktivierten Bakterien	14
2.5.	Tetanus-Toxoid kombiniert mit viralen Antigenen	17
C	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	28
1.	Material und Methoden	28
1.1.	Versuchstiere	28
1.2.	Impfstoffe	28
1.3.	Bestimmung der Kulturinfektiosität des Vaccinia-Virus "MVA"	30
1.4.	Aktiver Mäuseschutzversuch	30
1.5.	Blutentnahme	31
1.6.	Antitoxinbestimmung gegen Tetanus	31
1.6.1.	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	31

Seite

1.6.2. Indirekte Hämagglutination 32
1.7. Antikörperbestimmung gegen Pocken 32
1.7.1. Hämagglutinationshemmungstest 32
1.7.2. Neutralisationstest 33
1.8. Intrakutantest 34

2. Ergebnisse 36
2.1. Untersuchungen zur Wirksamkeit der Kombinationsvaccine "Pocken-Tetanus" bei Mäusen 36
2.2. Untersuchungen zur Wirksamkeit der Kombinationsvaccine "Pocken-Tetanus" bei Ferkeln 38
2.3. Untersuchungen zur Wirksamkeit der Kombinationsvaccine "Pocken-Tetanus" bei Affen 40
2.4. Untersuchungen zur Unschädlichkeit der Kombinationsvaccine "Pocken-Tetanus" bei Mäusen, Ferkeln und Affen 42
2.5. Untersuchungen zur Haltbarkeit der Kombinationsvaccine "Pocken-Tetanus" 43

D BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE 55

E ZUSAMMENFASSUNG 60
SUMMARY

F LITERATURVERZEICHNIS 62

G LEBENSLAUF 81

A EINLEITUNG

Nach der weltweiten Aufhebung der Pflichtimpfung gegen Pocken ist die Frage nach der Indikation eines Kombinationsimpfstoffes gegen Pocken und Tetanus mehr als berechtigt. Die Notwendigkeit einer Schutzimpfung gegen Tetanus ist zwar unbestritten. Eine Schutzimpfung gegen Pocken halten heute aber viele Experten für überflüssig, nachdem 1979 die WHO die Welt für pockenfrei erklärt hat. Folgende Gründe sprechen aber weiterhin dafür, Pockenimpfstoffe herzustellen und zu lagern, bzw. neue Pockenimpfstoffe zu entwickeln.

Trotz der Tatsache, daß seit 1977 kein Pockenfall mehr gemeldet wurde, ist die Gefahr einer Pockeninfektion für die Menschheit noch nicht gebannt. Das Variola-Virus kann z.B. noch unentdeckt in wenig erforschten Gebieten existieren. Da das Variola-Virus offiziell noch in Großbritannien, in den USA, in der UdSSR und in Südafrika vorrätig gehalten werden darf, besteht auch die Möglichkeit einer Laborinfektion und einer Weiterverbreitung aus diesen Instituten, wie der Ausbruch 1973 in London bewiesen hat. Nachdem die Bevölkerung durch die Aufhebung der Impfpflicht keinen Schutz gegen Pocken mehr aufweist, kommt das Variola-Virus auch als biologische Waffe in Betracht.

Obwohl das Variola-Virus kein tierisches Reservoir zu haben scheint, könnte der Mensch zukünftig unter bestimmten Bedingungen durch Tierpocken gefährdet sein, gegen die er bislang, wegen der starken Kreuzimmunität innerhalb der Pockenviren, durch die allgemeine Pockenschutzimpfung geschützt war. Hierfür kommen vor allem Virusarten des Genus Orthopoxvirus in Frage, wobei das Affenpockenvirus und die sich davon unterscheidenden "wilden bzw. weißen Pockenviren" besondere Aufmerksamkeit verdienen. Immunsuppressive endogene oder exogene Noxen wie auch entsprechende Umweltveränderungen können die Empfänglichkeit der Bevölkerung für tierische Pockenviren erhöhen. (Fenner 1977; Mayr und Danner 1978; Mayr et al. 1978; Ladnyi und Bieman, 1978; Mayr 1980).

Aus allen diesen Gründen ist es sinnvoll, der Pockenschutzimpfung weiter Beachtung zu widmen. Zur Herstellung der Kombinationsvaccine wurde der von Mayr entwickelte, attenuierte Vaccinia-Virusstamm "MVA" herangezogen, der gegenüber dem bisher verwendeten Vaccinia-Stamm "Elstree" den Vorteil hat, daß er gut verträglich ist, intramuskulär appliziert werden kann (Hochstein-Mintzel et al. 1975; Mayr et al. 1975, 1978) und im immunsupprimierten Organismus zu keinen Impferkrankungen führt (Singer 1978; Mayr et al. 1978; Mayr und Danner 1978). Eine Kombination mit der regelmäßig durchgeführten Tetanus-Schutzimpfung bot sich an, weil damit eine Aufnahme der Pocken-Schutzimpfung in den Impfkalender ohne besondere neue Einteilungen möglich wird und sich beide Impfungen in bezug auf Revaccination und Indikation sehr ähnlich sind.

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen über die Kombinierbarkeit von Tetanus-Toxoid und Vaccinia-Virus "MVA", sowie erste Ergebnisse aus Versuchen zur Bestimmung der Wirksamkeit, Unschädlichkeit und Stabilität der Kombinationsvaccine "Pocken-Tetanus" bei Ferkeln und Affen zusammengefaßt.

B SCHRIFTTUM

Tetanus-Toxoid in numerisch additiven Kombinationsimpfstoffen

1. Kombinationsimpfstoffe mit Tetanus-Toxoid in der Tiermedizin

1.1. Tetanus-Toxoid kombiniert mit anderen Clostridien-Toxoiden

Numerisch-additive Clostridienimpfstoffe finden praktisch nur bei Schafen Anwendung. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen, zum Teil im Handel erhältlichen Clostridien-Kombinationsimpfstoffe für das Schaf. Diese Impfstoffe bestehen in der Regel aus formalininaktivierten Toxinen der wichtigsten pathogenen Clostridenarten. In einigen Fällen wurden zusätzlich zu den Toxoiden noch mit Formalin inaktivierte Keime aufgenommen (Hepple und Jull 1960; Sterne et al. 1962; Thomson et al. 1969; Udovicic 1979). Die Verwendung von gereinigten, konzentrierten Toxoiden brachte eine bessere Verträglichkeit (Chodnik et al. 1959; Hepple und Jull 1960; Udovicic 1979), aber nach Immunisierung mit ungereinigten, sogenannten "natürlichen" Toxoiden war die Immunitätsbildung besser (Sterne et al. 1962; Thomson et al. 1969; Kerry und Thomson 1969).

Bei gereinigten Toxoidvaccinen traten Unverträglichkeitsreaktionen nur bei Zugabe von Adjuvantien auf öliger Basis (Mineralöl, Paraffinöl) auf. Schwere Lokalreaktionen an der Injektionsstelle ließen sich nach Impfung mit Öl-Adjuvans-Vaccinen nur durch die intraperitoneale Applikation umgehen (Thomson et al. 1969; Katitch et al. 1970; Frerichs und Gray 1975; Thomson und Knight 1976; Udovicic 1979). Auch bei Impfstoffen mit Freund'schem Adjuvans wurden an der Impfstelle starke lokale Reaktionen festgestellt (Sterne et al. 1962; Thomson et al. 1969). Eine gleich gute Adjuvanswirkung, aber eine wesentliche bessere Verträglichkeit brachte Aluminiumhydroxid als Adjuvans (Chodnik et al. 1959; Hepple und Jull 1960; Frerichs und Gray 1973, 1975; Gray 1976; Udovicic 1979). Nach Zugabe von Aluminiumhydroxid

konnten nach der Zweitimpfung ca. fünfmal höhere Antitoxintiter erzielt werden als mit einem Impfstoff ohne Adjuvans (Katitch et al. 1970). Auch Ka-aluminiumsulfat eignete sich als Adjuvans für numerisch additive Clostridienimpfstoffe (Sterne et al. 1962; Thomson und Knight 1976; Kerry und Thomson 1969).

Die Immunantwort auf die einzelnen Clostridien-Toxoide in einer Kombinationsvaccine war derjenigen ähnlich, die nach Impfung mit den entsprechenden Einfachvaccinen hervorgerufen wurde. Die verschiedenen Clostridien-Toxoide waren gut kombinierbar und behielten in der Mischung ihre Immunogenität (Chodnik et al. 1959). Teilweise wurden mit Kombinationsvaccinen bessere Ergebnisse erreicht als mit Einfachimpfstoffen. Chodnik et al. (1959) maßen nach einer Impfung mit einer Zweifachvaccine (C. tetani und C. welchii Typ D) bei Schafen höhere Antitoxintiter als nach alleiniger Tetanus-Schutzimpfung. Nach zweimaliger Impfung mit einer "7-fach"-Vaccine stiegen die Antitoxintiter gegen C.perfringens-Toxin auf 4,54 I.E./ml, nach Impfung mit einer monovalenten Vaccine nur auf 2,94 I.E./ml. Im Falle des Tetanus-Toxoids betrug der Unterschied zwischen der Mehrfach- und der Einfachvaccine 4,03 I.E. zu 2,57 I.E. pro ml Serum (Udovicic 1979).

Bei allen Impfstoffen konnten bereits nach einmaliger Impfung Antitoxintiter gemessen werden, die über der geforderten Schutzschwelle lagen. Diese Titer fielen aber innerhalb von wenigen Wochen stark ab, so daß für einen länger andauernden Schutz (ca. 1 Jahr) in jedem Fall eine zweite Impfung notwendig wurde. Auf die Zweitimpfung reagierten die Schafe mit einem ca. 10-fach höheren Antitoxintiteranstieg. Dafür mußte aber der Abstand zwischen Erst- und Zweitimpfung mindestens 3 Wochen betragen (Chodnik et al. 1959; Hepple und Jull 1960; Kerry und Thomson 1969; Katitch et al. 1971; Oxer et al. 1971).

Da neugeborene Lämmer besonders durch Tetanus und Breinierenkrankheit gefährdet sind, spielt die passive Immunität eine wichtige Rolle. Es wurde deshalb empfohlen, Mutterschafe zweimal im Abstand von 6 Wochen mit Clostridienimpfstoff zu immunisieren, wobei die zweite Impfung etwa 2 Wochen vor dem Ablammen erfolgen

soll. Bei älteren Mutterschafen reicht eine einmalige Auffrischungsimpfung 2 bis 3 Wochen vor dem Ablammen aus. Die Lämmer von geimpften Schafen sollen ab dem 4. Lebensmonat, Lämmer von nicht geimpften Schafen schon ab der 2. bis 4. Lebenswoche geimpft werden (Sterne et al. 1962; Kerry und Thomson 1969). Oxer et al. (1971) konnten dagegen bei Lämmern mit hohen maternalen Antikörpertitern keine Beeinträchtigung der aktiven Immunantwort beobachten.

Die routinemäßig vorgeschriebene Wirksamkeitsprüfung der für das Schaf bestimmten numerisch-additiven Clostridienvaccinen wurde an Kaninchen und Meerschweinchen durchgeführt (Sterne et al. 1962; Frerichs und Gray 1973, 1975). In Tabelle 2 sind die Grenzwerte nach zweimaliger Immunisierung zusammengestellt, wie sie im British Veterinary Codex von 1965 gefordert werden (Sterne et al. 1962; Frerichs und Gray 1975; Gray 1976). Bezüglich der Schutzschwellenwerte bei Schafen liegen ganz unterschiedliche Ergebnisse vor. Einen Überblick über die, von den verschiedenen Autoren geforderten Antitoxintiter-Grenzwerte bei Schafen gibt Tabelle 3.

1.2. Tetanus-Toxoid kombiniert mit viralen Antigenen

Kombinationsimpfstoffe gegen Tetanus und Influenza sind für das Pferd schon lange im Handel. Für beide Krankheiten ist das Pferd hoch empfänglich. Einen sicheren Schutz bietet nur eine regelmäßige Immunisierung. Nachdem Schmidt (1967) nachweisen konnte, daß sich Tetanus-Toxoid und inaktiviertes Influenza-Virus in Bezug auf die Immunitätsentwicklung nicht negativ beeinflussen, sind verschiedene numerisch-additive Kombinationsvaccinen gegen Tetanus und Influenza entwickelt worden (Jaeger und Barth 1972; Bommeli et al. 1980; Valette und Petermann 1980). Unter experimentellen Bedingungen ließ sich nachweisen, daß die Immunogenität von Influenza A_2 und B in der Kombinationsvaccine verstärkt wird, was für einen Adjuvanseffekt des Tetanus-Toxoids spricht (Schmidt 1967). Einen Überblick über die bekannten Kombinationsvaccinen gegen Tetanus und Influenza beim Pferd und deren Zusammensetzung (soweit bekannt) gibt Tabelle 4.

Für die Grundimmunisierung werden 2 Impfungen ab dem 4. Lebensmonat in einem Abstand von 4 bis 6 Wochen empfohlen. Gegen Influenza ist eine 3. Impfung nach 6 Monaten erforderlich und eine Wiederholungsimpfung nach 6 bis maximal 9 Monaten. Für die Tetanus-Komponente genügt eine Wiederholungsimpfung in 3-jährigem Intervall.

Erste Ergebnisse liegen über eine erweiterte Kombinationsvaccine gegen Tetanus, Influenza und Tollwut vor. Nach Valette und Petermann (1980) ist es möglich, Tetanus-Toxoid und inaktiviertes Influenza- und Tollwut-Virus ohne Wirksamkeitsverlust für eine Komponente in einer Kombinationsvaccine aufzunehmen.

Tabelle 1: Numerisch-additive Kombinationsimpfstoffe gegen Clostridienintoxikationen beim Schaf

Impfstoff Herkunftsland	Zusammensetzung Toxoide	Adjuvans	Applikation	Indikation	Autor
"Pulpivax" (Wellcome Res. Lab.)	C. tetani 7 Lf C. welchii Typ D 60 Lf	Ka-aluminium-sulfat	Subkutan	Tetanus Breinierenkrankheit	
Irland (Glaxo Laboratories)	C. tetani C. welchii Typ D	Aluminium-hydroxid	o.A.	Tetanus Breinierenkrankheit	Chodnik et al.,1959
Australien (Commonwealth Serum Lab.)	C. tetani C. welchii Typ D	Aluminium-hydroxid	o.A.	Tetanus Breinierenkrankheit	Oxer et al.,1971
England	C. tetani C. welchii Typ D C. septicum C. chauvoei	Aluminium-hydroxid	subkutan	Tetanus Breinierenkrankheit Geburtsrauschbrand Rauschbrand	Hepple und Jull, 1960
England (Wellcome Res. Lab.)	C. tetani C. welchii Typ B C. welchii Typ D C. septicum C. oedematiens Typ B	o.A.	subkutan	Tetanus Lämmerdysenterie Breinierenkrankheit Geburtsrauschbrand Deutscher Bradsot	Knight und Lucken 1976
Jugoslawien (Faculté Vét. de Belgrade)	C. tetani C. welchii Typ B E. welchii Typ D C. septicum C. oedematiens	Aluminiumgel	subkutan	Tetanus Lämmerdysenterie Breinierenkrankheit Geburtsrauschbrand Deutscher Bradsot	Katitch et al.,1971
		Paraffinöl	intraperi-toneal		
England (Wellcome Res. Lab.)	C. tetani C. welchii Typ B C. welchii Typ C C. welchii Typ D C. septicum C. oedematiens C. chauvoei	Ka-aluminium-sulfat	subkutan	Tetanus Lämmerdysenterie Struck Breinierenkrankheit Geburtsrauschbrand Deutscher Bradsot Rauschbrand	Sterne et al.,1962
		Freund´sches Adjuvans			

Fortsetzung Tabelle 1

Impfstoff Herkunftsland	Zusammensetzung Toxoide	Adjuvans	Applikation	Indikation	Autor
England (Central Vet. Lab. . Weybridge)	C. tetani C. welchii Typ B C. welchii Typ D C. septicum C. oedematiens Typ B C. oedematiens Typ D C. chauvoei	Aluminium-hydroxid	subkutan	Tetanus Lämmerdysenterie Breinierenkrankheit Geburtsrauschbrand Deutscher Bradsot Rauschbrand	Frerichs und Gray, 1973, 1975
		Ölemulsion	intra-peritoneal		
"Pliva" Jugoslawien (Res. Inst. Zagreb)	C. tetani 10 Lf C. welchii Typ A 2,4 L+ C. welchii Typ C 54,6 L+ C. welchii Typ D 9,6 Lf C. septicum 33,6 Lf C. oedematiens Typ B 62 L+ C. chauvoei 0,5 ml	Aluminium-hydroxid	subkutan	Tetanus Gasbrand Struck Breinierenkrankheit Geburtsrauschbrand Deutscher Bradsot Rauschbrand	Udovicic,1979
"Pliva" Jugoslawien (Res. Inst. Zagreb)	C.tetani 20 Lf C. welchii Typ A 4,8 L+ C. welchii Typ C 109,2 L+ C. welchii Typ D 19,2 Lf C. septicum 67,2 Lf C. oedematiens Typ B 124 L+	Aluminium-hydroxid	subkutan	Tetanus Gasbrand Struck Breinierenkrankheit Geburtsrauschbrand Deutscher Bradsot	Udovicic,1979
		Paraffinöl	intra-peritoneal		
"Covexin" (Wellcome)	C. tetani 4 Lf C. welchii Typ B 45 BE C. welchii Typ C C. welchii Typ D 60 Lf C. oedematiens Typ B 5 Lf C. oedematiens Typ D 10 BE C. septicum 10 Lf C. chauvoei 10 I.Tr.	Ka-aluminium-sulfat	subkutan	Tetanus Lämmerdysenterie Struck Breinierenkrankheit Deutscher Bradsot Deutscher Bradsot Geburtsrauschbrand Rauschbrand	Kerry u. Craig,1979 Thomson u. Knight,1976
"Omnivax" (Wellcome)		Mineralöl	intra-peritoneal		Thomson et al.,1969 Thomson u. Knight,1976 Katitch et al. 1970

Lf = Flockungseinheiten
L+ = Dosis des Toxins, aus dem das Toxoid hergestellt wurde
BE = Bindungseinheiten
I.Tr. = Internationale Trübungseinheiten

Tab. 2: Grenzwerte für die Wirksamkeitsprüfung von Clostridienimpfstoffen an Kaninchen (British Veterinary Codex 1965)

C. welchii β	10	I.U./ml
C. welchii ε	5	I.U./ml
C. oedematiens	3,5	I.U./ml
C. septicum	2,5	I.U./ml
C. tetani	2,5	I.U./ml

Tab. 3: Schutzschwellenwerte für Clostridien-Toxoid-Impfstoffe beim Schaf

Angaben von	Toxoid	Grenztiter I.U./ml
Chodnik et al.1959	C. tetani	0,01
	C. welchii Typ D	0,20
Sterne et al. 1962	C. welchii Typ B	0,50
	C. welchii Typ D	0,15
Oxer et al. 1971	C. welchii Typ D	0,25
Kerry und Craig, 1979	C. welchii ε	1,00
	C. tetani	1,00
	C. oedematiens Typ B	0,50

Tabelle 4: Numerisch additive Kombinationsvaccinen gegen Tetanus und Influenza beim Pferd

Handelsname Herkunft	Zusammensetzung	Adjuvans	Applikation	Autor
"Prevacun T" BRD (Behringwerke)	Influenza-Virus inaktiviert: A equi 1/Prag/56 500 HAE A equi 2/Miami/63 1000 HAE Tetanus Adsorbat Impfstoff: 150 I.E.	Aluminium-hydroxid	i.m.	Jaeger und Barth, 1972 Bommeli et al. 1980
"Fluvac T" USA (Fort Dodge)	Influenza-Virus inaktiviert: A equi 2/Lexington Tetanus-Toxoid	Aluminium-phosphat	i.m.	Bommeli et al. 1980
"Duvaxyn IET" Holland (Philips-Duphar)	Influenza-Virus inaktiviert: A equi 1/Prag/56 A equi 2/Miami/63 Tetanus-Toxoid	Aluminium-phosphat	i.m.	Bommeli et al. 1980

I.E. = Internationale Einheiten

HAE = Hämagglutinierende Einheiten

2. Kombinationsimpfstoffe mit Tetanus-Toxoid in der Humanmedizin

2.1. Tetanus-Toxoid kombiniert mit anderen Clostridien-Toxoiden

Numerisch-additive Clostridien-Toxoid-Impfstoffe gibt es in unterschiedlichster Zusammensetzung von 2 bis maximal 8 verschiedenen Toxoiden. Sie wurden beim Menschen zur kombinierten Bekämpfung gegen Tetanus und Gasödemerkrankungen entwickelt. Während die Tetanusprophylaxe auch heute noch ein wichtiger Bestandteil des Impfprogrammes ist, haben Kombinationsimpfstoffe gegen Gasödemerreger nur in Kriegs- und Katastrophenzeiten eine größere Bedeutung, wenn eine optimale Wundversorgung nicht sichergestellt werden kann. Die bisher erprobten Mehrfachimpfstoffe gegen Clostridientoxine sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Eine Kombination mehrerer Clostridientoxoide brachte in der Regel keinen Wirksamkeitsverlust für die einzelnen Komponenten. Nur nach Zugabe von Tetanus-Toxoid zu C. oedematiens-Toxoid waren die Antitoxintiter gegen C. oedematiens etwa ein Drittel niedriger als nach alleiniger Impfung, während die Immunreaktion gegenüber dem Tetanus-Toxoid gleich blieb. Der Abfall der C. oedematiens-Komponente in der Kombinationsvaccine konnte aber durch eine höhere Toxoiddosis kompensiert werden (Engelhardt und Pranter 1967). Der Schutz nach zweimaliger gleichzeitiger Immunisierung gegen C. tetani und C. oedematiens vor einer tödlichen Toxindosis betrug mindestens 2 Jahre (Klose 1970).

Bei einem Vergleich zweier Kombinationsvaccinen, die entweder mit ungereinigten, konzentrierten Toxoiden von C. welchii und C. tetani oder mit gereinigten, aluminiumpräzipitierten Toxoiden hergestellt wurden, brachte letztere Vaccine das bessere Immunisierungsergebnis (Penfold et al. 1941; Vlasova und Larina 1969). In Rußland wurden bei Rhesusaffen Immunisierungsversuche mit einem Kombinationsimpfstoff aus 8 verschiedenen Clostridientoxoiden durchgeführt (Zusammensetzung siehe Tabelle 5). Schon nach einmaliger Impfung ließen sich, mit Ausnahme von C. perfringens, Antitoxine gegen die verschiedenen Toxoide im Serum nachweisen (Larina 1966).

Über Impfreaktionen bei der Verwendung von numerisch-additiven Kombinationsvaccinen gegen Clostridien-Toxine wurde weder in Tierversuchen noch bei der Anwendung bei Freiwilligen in der Literatur berichtet (Ugleva et al. 1960; Larina 1966).

2.2. Tetanus-Toxoid kombiniert mit Diphtherie-Toxoid

Kombinationsvaccinen mit Tetanus- und Diphtherie-Toxoid nehmen seit vielen Jahren einen festen Platz in dem Impfkalender von Kindern und auch Erwachsenen ein. Beide Impfungen gehören in der BRD zu den allgemein empfohlenen Impfungen. Kombinationsvaccinen gegen Tetanus und Diphtherie enthalten heute konzentrierte, gereinigte und mit Formalin inaktivierte Toxine von C. tetani und Corynebacterium diphtheriae. Beide Toxoide lassen sich gut kombinieren. Nach Immunisierung mit Kombinationsvaccinen konnten sogar höhere postvaccinale Antitoxintiter gemessen werden als nach Impfungen mit den Einzeltoxoiden, wobei die Immunogenität des Tetanus-Toxoids in der Regel in der Kombinationsvaccine mehr gesteigert wurde als die Wirkung des Diphtherie-Toxoids (Hennessen et al. 1961; Herrlich 1965; Smith 1969).

Die Diphtherie-Tetanus-Kombinationsvaccinen gibt es in unterschiedlicher Zusammensetzung. Die verschiedenen Impfstoffe sind im einzelnen in Tabelle 6 zusammengestellt. Bei Kindern wird in der BRD eine Grundimmunisierung ab dem 3. Lebensmonat mit 2 Impfungen in einem Abstand von sechs Wochen und einer 3. Impfung ab dem 15. Lebensmonat empfohlen (Sitzmann 1981). Die Grundimmunisierung für Erwachsene soll mit 2 Impfungen in einem Abstand von 4 bis 8 Wochen und einer 3. Impfung nach 6 bis 12 Monaten durchgeführt werden (Edsall et al. 1954; Smith 1969; Ruben et al. 1978; Advisory Committee USA 1981). Bei exponierten Personen wird alle 3 bis 4 Jahre eine Wiederholungsimpfung vorgeschlagen (Volk et al. 1962). Auffrischungsimpfungen empfehlen sich in jedem Fall bei Schulabschluß, Wehrdienst und Schwangerenvorsorge (Pilars und Spiess 1981). Für Massenimpfungen in Ländern, wo ein Impfprogramm schwer durchzuführen ist, wird ein Impfstoff empfohlen, der wegen der höheren Toxoiddosis nur zwei-

mal verabreicht werden muß (Cabau et al. 1970).

In der Praxis werden Tetanus-Diphtherie-Impfstoffe subkutan oder intramuskulär verabreicht. Fontanges et al. (1971) berichten über Ergebnisse bei Affen nach dreimaliger Aerosol-Immunisierung in 20-tägigem Abstand. Die intranasale Immunisierung mit der Kombinationsvaccine führte schon drei Tage nach der letzten Impfung zu maximalen Antitoxintitern gegen Diphtherie und Tetanus. Die Werte lagen höher als nach Aerosol-Immunisierung mit den Einzeltoxoiden und lagen noch nach 18 Monaten im Schutzbereich.

Greenberg und Fleming (1950) versuchten Erwachsene und Kinder oral mit Tabletten zu immunisieren, die 2000 Lf Diphtherie- und 320 Lf Tetanus-Toxoid enthielten. Nach viermaliger Impfung mit jeweils 2 Tabletten antwortete nur einer von zehn Impflingen mit Antitoxintitern gegen beide Toxoide, zwei von zehn nur auf das Diphtherietoxoid und einer auf das Tetanus-Toxoid.

Zwisler und Ronneberger (1978) verabreichten, nach vorheriger subkutaner Primärimpfung, Hunden 3 mal 3 Kapseln mit je 500 Lf Tetanus- und Diphtherie-Toxoid. Nach dieser oralen Boosterimpfung stiegen bei allen Tieren die Antitoxintiter gegen beide Toxoide stark an. Eine orale oder buccale Immunisierung allein brachte dagegen keine nachweisbaren Antitoxintiter. Da die große Toxoidmenge, die für diesen Impfstofftyp notwendig ist, bei weitem die wirtschaftlichen Grenzen überschreitet, wird eine orale Kombinationsimpfung gegen Diphtherie und Tetanus beim Menschen abgelehnt. Unverträglichkeitsreaktionen nach Immunisierung mit der Kombinationsvaccine Diphtherie-Tetanus gehen vor allem zu Lasten der Diphtherie-Komponente und treten in Form von lokalen Schwellungen und Rötungen an der Impfstelle, erhöhter Temperatur und gestörtem Allgemeinbefinden vor allem bei Jugendlichen und Erwachsenen auf, die entweder durch eine vorangegangene Impfung oder Infektion schon Antikörper gegen Diphtherie gebildet hatten (Herrlich 1965; Mc Comb und Levine 1961; Sitzmann 1981). Durch Verwendung von hochgereinigten Diphtherie-Toxoiden (Edsall et al. 1954; Relyveld et al. 1979) oder durch Prüfung der Impfpersonen vor der Impfung mittels des Schick-Tests auf eine

eventuell schon vorhandene Immunität (Edsall et al. 1954) liessen sich die Impfreaktionen wesentlich verringern. Postvaccinale allergische Reaktionen ließen sich auch vermeiden, wenn die Diphtherie-Toxoiddosis in der Kombinationsvaccine reduziert wurde (Edsall et al. 1954; Levine et al. 1961; Mc Comb und Levine 1961; Volk et al. 1962; Feeley et al. 1979).

2.3. Tetanus-Toxoid kombiniert mit Diphtherie- und Staphylokokken-Toxoid

Schon 1940 verglichen Ramon et al. die Wirksamkeit einer Kombinationsvaccine aus Tetanus-, Diphtherie- und Staphylokokkentoxoid mit den entsprechenden monovalenten Impfstoffen. Nach Impfung von Kaninchen mit der Kombinationsvaccine waren die Antitoxintiter gegen Diphtherie und Tetanus gleich, die Antitoxintiter gegen Staphylokokken um die Hälfte niedriger als diejenigen nach Immunisierung mit der entsprechenden monovalenten Vaccine.

Keine immunologische Konkurrenz der Toxoide fanden dagegen Davidov (1960) und Titarenko (1962) bei subkutaner oder intranasaler Immunisierung mit einer Dreifachvaccine gegen Tetanus, Diphtherie und eine Staphylokokkeninfektion. Erst nach Überdosierung einer Komponente wurde die Immunantwort auf die anderen Toxoide teilweise unterdrückt.

2.4. Tetanus-Toxoid kombiniert mit Toxin/Toxoid und inaktivierten Bakterien

Der Dreifachimpfstoff gegen Tetanus, Diphtherie und Keuchhusten ist heute ein fester Bestandteil des Impfprogrammes bei Kindern. Diese Impfstoffe enthalten in der Regel formalininaktivierte Toxine von Clostridium tetani und Corynebacterium diphtheriae sowie formalininaktivierte Bakterien von Bordetella pertussis. Tabelle 7 gibt einen Überblick über die wichtigsten Kombinationsimpfstoffe gegen Tetanus, Diphtherie und Keuchhusten, ihre Dosierung, sowie ihre Anwendung.

Als Grundimmunisierung wird eine dreimalige Impfung im Abstand von 4 bis 8 Wochen mit einer Auffrischungsimpfung nach einem Jahr empfohlen. Da maternale Antikörper die aktive Immunisierung stören können, soll erst ab dem 3. Lebensmonat mit der aktiven Impfung begonnen werden (Griffith 1979).

Die Toxoidkomponenten werden durch die Pertussis-Keimsuspension nicht beeinträchtigt, im Gegenteil, die Wirksamkeit der Toxoide wird in der Kombinationsvaccine gesteigert (Fleming und Greenberg 1950; Herrlich 1965; Griffith 1979). Nach zweimaliger Impfung von Erwachsenen mit der Kombinationsvaccine schwankte z.B. der Tetanus-Antitoxintiter zwischen 0,2 und 30 I.E. pro ml, dagegen nach monovalenter Tetanus-Impfung zwischen 0,6 und 3 I.E. pro ml (Volk 1963). Die Wirksamkeit der Pertussiskomponente ist umstritten. Es wird deshalb weltweit an einer Verbesserung der Pertussiskomponente gearbeitet. Gute Chancen bestehen nach neuesten Untersuchungen für einen Extrakt aus Bordetella pertussis-Keimen (Schweier 1980; Mayser 1981).

Die Ergänzung der Diphtherie-Tetanus-Vaccine durch die Pertussis-Komponente brachte auch eine wesentliche Erhöhung der postvaccinalen Komplikationen mit sich. In den USA traten bei 70% der Impflinge lokale Reaktionen auf, bei 50% Fieberreaktionen und in einigen Fällen neurologische Reaktionen, Urticaria und anaphylaktischer Schock (Advisory Committee USA 1981). Barkin und Pichichero (1979) registrierten bei 72,2% der Impflinge Lokalreaktionen und bei 53,6% Fieberreaktionen. Nur 7% der Impflinge vertrugen die Impfung reaktionslos. In der Bundesrepublik wurde eine Schadenshäufigkeit von 1:39.914 (Ehrengut 1974, 1980) und in der DDR von 1:20.600 (Müller und Haupt 1979) für den Kombinationsimpfstoff "Diphtherie-Tetanus-Pertussis" errechnet. Bei Säuglingen kam es gelegentlich zu neurologischen Komplikationen (Volk et al. 1953; Ström 1967; Müller und Haupt 1979).

Da mit den Zweifachimpfstoffen mit Diphtherie- und Tetanus-Toxoid keine Impfreaktionen in dieser Häufigkeit auftraten, werden sie allgemein der Pertussis-Komponente zugesprochen (Hooker 1981). Die meisten Impfreaktionen traten innerhalb

24 Stunden post vaccinationem auf, so daß eine allergische Genese ausscheidet (Volk et al. 1953; Brouwer und Cohen 1976; Ehrengut 1974). Als Ursache für die Impfreaktionen werden ein extrazellulärer thermostabiler Faktor oder das Endotoxin diskutiert (Hemert 1969; Ström 1967; Ehrengut 1974).

Der Zusatz von Aluminiumhydroxid oder Aluminiumphosphat steigerte nicht nur die antigene Wirksamkeit der Kombinationsvaccine, sondern senkte auch die Impfschadensquote (Cameron 1980; Hooker 1981). Der Adsorbatimpfstoff eignet sich aber nur zur intramuskulären Applikation, da bei subkutaner Verabreichung Lokalreaktionen an der Injektionsstelle auftreten (Butler et al. 1969).

In Tabelle 8 sind Kombinationsimpfstoffe zusammengestellt, in denen Tetanus-Toxoid mit anderen Toxoiden und/oder mit inaktivierten Salmonella typhi- oder Salmonella paratyphi-Keimen kombiniert wurde. Wie bei dem Diphtherie-Tetanus-Pertussis-Impfstoff (DTP) wirkten auch hier die inaktivierten Salmonella-Keime als Adjuvans und erhöhten die Wirksamkeit der Toxoidkomponenten (Ramon und Zoeller 1926; Sellers et al. 1951; Lepik 1963; Vygodchikov et al. 1963; Herrlich 1965). Die Wirksamkeit der Typhuskomponente blieb dagegen unbefriedigend (Rainsford 1942; Bernard et al. 1962). Auch traten durch Zugabe der Salmonella-Keimsuspension bei diesem Impfstofftyp starke Impfreaktionen auf, die auf den Pyrogen- bzw. Endotoxingehalt der Salmonella-Bakterien zurückzuführen waren (Regamey 1944; Ikic 1958). Die Reaktionen konnten durch die Impfung mittels Aerosol verhindert werden (Egorova 1968; Alexandrov et al. 1970). In der Praxis konnten sich aber die Kombinationsvaccinen Tetanus-Toxoid mit Salmonella-Keimen bisher nicht durchsetzen.

Ähnlich verhält es sich mit einer Kombinationsvaccine, die neben Tetanus-Toxoid, Diphtherie-Toxoid, inaktivierten Bordetella pertussis- und Salmonella typhi und S. paratyphi-Keimen noch zusätzlich Toxine des Scharlacherregers Streptococcus pyogenes enthielt. Aber auch in dieser Vaccine war die Scharlachkomponente wirksamer als in der entsprechenden monovalenten Scharlachvaccine (Volk et al. 1953).

2.5. Tetanus-Toxoid kombiniert mit viralen Antigenen

Größte Bedeutung unter diesen Kombinationsvaccinen besitzen Impfstoffe mit Diphtherie-, Tetanus-, Pertussis-Antigenen und inaktivierten Poliomyelitisviren der Typen I (Mahoney), II (MEF_1) und III (Saukett).

Wirksamkeitsprüfungen der Kombinationsimpfstoffe bestätigten, daß sich die Poliomyelitisantigene ohne Verlust mit Toxoiden und inaktivierten Bakterien kombinieren lassen. Im Gegenteil, die Antikörpertiter gegen die 3 Poliomyelitisvirustypen waren nach der Immunisierung mit der Kombinationsvaccine höher als nach Immunisierung mit monovalenter Poliomyelitisvaccine (Bordt et al. 1960; Schuchardt et al. 1960; Hennessen et al. 1961). Mit der Kombinationsvaccine "Compligen" konnten auch höhere Antitoxintiter gegen die Diphtheriekomponente als nach monovalenter Immunisierung nachgewiesen werden. Die Wirkung der Tetanus- und Bordetella pertussis-Komponenten blieb dagegen in der Kombinationsvaccine gleich wie in den monovalenten Impfstoffen (Bordt et al. 1960; Schuchardt et al. 1960). Nach längerer Aufbewahrung der ungereinigten Diphtherie-Tetanus-Poliomyelitis (DTP-Polio)-Kombinationsvaccine tritt ein Wirksamkeitsverlust bei der Bordetella pertussis-Komponente auf. Er beträgt nach Pittmann (1962) etwa 6% pro Monat. Die Ursache ist in den Nichtvirusbestandteilen der Poliomyelitiskomponente, z.B. Fermente aus den Gewebekulturen und bei den virusspezifischen Stabilisatoren, zu suchen. Abhilfe kann durch Fermentinhibitoren, Reinigung des Virusanteiles oder Zusatz von geeigneten Stabilisatoren wie z.B. Sodium-EDTT (Beale und Ungar 1962) oder Benzethoniumchlorid (Maeve und Petersen 1982) geschaffen werden (Edsall et al. 1962; Pittmann 1962).

In der BRD werden zur Grundimmunisierung mit DTP-Polio-Impfstoffen 3 Impfungen ab dem 3. bis 4. Lebensmonat im Abstand von 4 bis 6 Wochen mit einer Auffrischungsimpfung nach 9 bis 12 Monaten vorgeschlagen (List und Hörhammer 1971).

Nach Impfung mit der Vierfachvaccine DTP-Polio zeigen sich gelegentlich leichte, lokale Reaktionen (Schwellungen, Rötungen)

oder leichte Temperaturerhöhungen, die jedoch nicht der Poliokomponente zuzuschreiben sind, da dieselben Reaktionen auch nach DTP-Impfungen zu beobachten sind (Hennessen et al. 1961).

Für Kinder, bei denen eine Impfung gegen Keuchhusten kontraindiziert bzw. nicht notwendig ist, steht ein Kombinationsimpfstoff mit Tetanus-, Diphtherie-Toxoid und Poliomyelitis-Antigen ("Tri-Virelon", Behringwerke) zur Verfügung. Ältere Kinder, Jugendliche und Erwachsene können mit einem Kombinationsimpfstoff, der nur Tetanus-Toxoid und Poliomyelitisantigen ("Tetanol-Virelon", Behringwerke) enthält, geimpft werden (List und Hörhammer 1971).

Nachdem es gelungen war, eine Spaltvaccine gegen Masern zu entwickeln, wurde eine Eingliederung dieser Masernkomponente in den Vierfachimpfstoff gegen Tetanus, Diphtherie, Keuchhusten und Poliomyelitis versucht. Als Masernkomponente wird in Deutschland der Virusstamm Marburg 1677, in anderen Ländern der Masernvirusstamm Edmonston B verwendet (Brouwer 1976). In der Kombinationsvaccine blieb die immunisierende Eigenschaft des Masernantigens unbeeinträchtigt (Enders-Ruckle et al. 1966). Wie Versuche bei Meerschweinchen zeigten, war die Wirkung der Masernkomponente in der Kombinationsvaccine sogar um das 2 bis 4fache höher als in der monovalenten Masernvaccine (Ast et al. 1967).

Für eine Grundimmunisierung mit der Kombinationsvaccine gegen Tetanus-Diphtherie-Poliomyelitis, Keuchhusten und Masern werden in der BRD 3 Impfungen in 4-wöchigem Abstand und eine Wiederholungsimpfung nach 9 bis 12 Monaten empfohlen (List und Hörhammer 1971). Hohe und langanhaltende Antikörpertiter gegen Masern werden erzielt, wenn nach einer Grundimmunisierung mit der Fünffachvaccine eine Revaccination mit einer Masernlebendvaccine erfolgt, oder eine natürliche Infektion mit Feldvirus stattfindet (Cohen et al. 1973; Brouwer 1976). Durch die vorhergegangene Grundimmunisierung mit der Fünffachvaccine, die inaktiviertes Masernantigen enthält, wurden die klinischen Reaktionen, die nach Impfungen mit der Masernlebendvaccine häufig vorkommen, abgeschwächt (Ast et al. 1967). Die leichten Temperaturerhöhungen, die nach der

Immunisierung mit der Fünffachvaccine, die inaktiviertes Masernantigen enthält, vorkommen, sind der Pertussiskomponente zuzuschreiben (Enders-Ruckle et al. 1966; Henigst und Müller 1966; Brouwer 1976).

Neben diesen bereits in den Impfkalender aufgenommenen bekannten Kombinationsvaccinen, die neben anderen Antigenen auch Tetanus-Toxoid und virale Antigene enthalten, gibt es einige Impfstoffe in der Entwicklung, bei denen versucht wird, Tetanus-Toxoid mit anderen Virusantigenen zu kombinieren. So wurde versucht, einen Impfstoff gegen Tetanus, Masern, Gelbfieber und Pocken zu entwickeln. Erste Vorversuche verliefen aber unbefriedigend (Gateff et al. 1973).

Nicht sehr erfolgreich verliefen auch Versuche mit einer Kombinationsvaccine, die nur Tetanus- und Diphtherie-Toxoid sowie Vaccinia-Virus "Elstree" enthielt. Nur Dostal und Haentzel (1967), die Erwachsene mit dem Tetanus-Diphtherie-Pocken-Impfstoff intradermal mit 0,1 ml durch Jet-Injektion immunisierten, stellten keine Beeinträchtigung der Immunitätsentwicklung gegen alle 3 Antigene fest. In Kaninchenversuchen mit einem Kombinationsimpfstoff, der Vaccinia-Virus "Elstree" und Tetanus-Toxoid enthielt und zweimal intrakutan appliziert wurde, kam es zwar zu keiner Beeinträchtigung der Wirksamkeit des Pockenimpfstoffes, aber zu einer Minderung der Tetanus-Immunität (Stein 1975). Der negative Einfluß des Vaccinia-Virus auf die Tetanus-Komponente bei Verwendung einer Kombinationsvaccine aus Tetanus-Toxoid und Vaccinia-Virus wurde auch von Ikic (1969) und Higy-Mandic (1965) bestätigt.

Tabelle 5: Numerisch-additive Kombinationsimpfstoffe gegen Clostridienintoxikationen beim Menschen

Herkunftsland	Zusammensetzung Toxoide	Adjuvans	Indikation	Autor
Australien (Baker Inst. of Med. Res.)	C. tetani C. welchii	aluminium-präzipitiert	Tetanus Gasödem	Penfold et al.,1941
Deutschland (Behringwerke)	C. tetani 20 Lf C. oedematiens 0,1 CU	Aluminium-hydroxid	Tetanus Gasödem	Engelhardt und Pranter, 1967
Deutschland (Behringwerke)	C. tetani 0,004 ml Tetanol C. oedematiens 0,6 ml	Aluminium-hydroxid	Tetanus Gasödem	Klose, 1970
Rußland	C. tetani C. oedematiens C. perfringens C. septicum	o.A.	Tetanus Gasödem " "	Ugleva et al.,1960
Rußland	C. tetani C. oedematiens C. septicum C. histolyticum C. sordelli C. perfringens	Aluminium-hydroxid	Tetanus Gasödem " " " "	Vlasova und Larina, 1969
Rußland	C. tetani C. oedematiens C. perfringens C. botulinum Typen: A, B, C, D und E	o.A.	Tetanus Gasödem " Botulismus	Larina, 1966

CU = Combining Units
Lf = Flockungseinheiten

o.A. = ohne Angaben

Tabelle 6: Numerisch-additive Kombinationsimpfstoffe gegen Tetanus und Diphtherie beim Menschen

Impfstoff Herkunftsland	Zusammensetzung Toxoide			Adjuvans	Applikation	Autor
"DT" Deutschland (Behringwerke)	C. tetani Coryneb.diphtheriae	50 50	I.E. I.E.	Aluminium-hydroxid	subkutan	Behring Codex, 1964
"IPAD-DT" Frankreich (Pasteur Inst.)	C. tetani Coryneb.diphtheriae	30 30	Lf Lf	Calcium-phosphat	subkutan	Cabau et al., 1970
USA (Michigan Dep. of Health)	C. tetani Coryneb.diphtheriae	2 2	Lf Lf	Aluminium-phosphat	intramuskulär	Volk et al., 1962
"Td" USA (Massachusetts Publ.Hlth.Lab.)	C. tetani Coryneb.diphtheriae	5 1	lf Lf	Aluminium-phosphat	o.A.	Levine et al.,1961 Edsall et al.,1954
	C. tetani Coryneb.diphtheriae	1 1	Lf Lf	Aluminium-phosphat	o.A.	Levine et al.,1961
"Td" USA	C. tetani Coryneb.diphtheriae	0,2 0,2	Lf Lf	ohne Adjuvans	subkutan	Mc Comb und Levine, 1961
"Td" USA	C. tetani Coryneb.diphtheriae	5-10 1- 2	Lf Lf	Aluminium-phosphat	o.A.	Feeley et al., 1979
"Td" USA (Eli Lilly & Co.)	C. tetani Coryneb.diphtheriae			aluminium-präzipitiert	o.A.	Ruben et al., 1978
Frankreich (Pasteur Inst. Mérieux)	C. tetani Coryneb.diphtheriae	20 25	Lf Lf	o.A.	Aerosol	Fontanges et al.,1971
Kanada (Connaught Med. Res. Lab.)	C. tetani Coryneb.diphtheriae	320 2000	Lf Lf	o.A.	oral	Greenberg und Fleming, 1950
Deutschland (Behringwerke)	C. tetani Coryneb.diphtheriae	0,22 0,68	Lf Lf	o.A.	subkutan	Zwisler und Ronneberger, 1978
	C. tetani Coryneb.diphtheriae	500 500	Lf Lf	o.A.	oral	

I.E. = Internationale Einheiten
Lf = Flockungseinheiten
o.A. = ohne Angaben

Tabelle 7: Numerisch-additive Kombinationsimpfstoffe gegen Tetanus, Diphtherie und Keuchhusten

Herkunftsland	Zusammensetzung	Adjuvans	Applikation	Autor
Deutschland (Behringwerke)	C. tetani 50 I.E. Toxoid Coryneb.diphtheriae 50 I.E. Toxoid B. pertussis 4 I.E. Keime, inaktiviert	Aluminium-hydroxid und Aluminiumphosphat	intramuskulär	Behring Codex, 1964 List u. Hörhammer, 1971
Holland (Rijks Inst. voor de Volks-gezondheit)	C. tetani 10 Lf Toxoid Coryneb.diphtheriae 15 Lf Toxoid B. pertussis 16 I.O.U. Keime, inaktiviert	Aluminiumphosphat	o.A.	Mahieu et al., 1978 Mangay-Angara, 1980
England	C. tetani 5 Lf Toxoid Coryneb.diphtheriae 28 Lf Toxoid B. pertussis 20×10^9 Keime, inaktiviert	Aluminium-hydroxid	subkutan	Butler et al., 1969
USA	C. tetani 5 Lf Toxoid Coryneb.diphtheriae 7,5-12,5 Lf Toxoid B. pertussis 4 P.U. Keime, inaktiviert	o.A.	intramuskulär	Barkin u. Pichichero, 1969
USA	C. tetani 2 Lf Toxoid Coryneb.diphtheriae Toxoid B. pertussis Keime, inaktiviert	Aluminiumphosphat	intra-muskulär	Volk et al., 1963
Deutschland	C. tetani 500 Lf Toxoid Coryneb.diphtheriae 500 Lf Toxoid B. pertussis 30×10^9 und 200×10^9 Keime, inaktiviert	o.A.	oral	Zwisler u. Ronneberger 1978

I.E. = Internationale Einheiten
I.O.U. = International Opacity Units
P.U. = Protective Units
Lf = Flockungseinheiten
o.A. = ohne Angaben

Tabelle 8: Numerisch-additive Kombinationsimpfstoffe gegen Tetanus und Typhus- Paratyphus

Impfstoff Herkunftsland	Zusammensetzung	Adjuvans	Applikation	Indikation	Autor
"TAB-T"	C. tetani 100 I.E. Toxoid S. typhi 1000 Mill. Keime, inaktiviert S. paratyphi A 250 Mill. " " " B 250 Mill. " "	Aluminium-hydroxid	subkutan	Tetanus Typhus Paratyphus	Behring Codex, 1964 List u. Hörhammer, 1971
Frankreich (Pasteur Inst. Paris)	C. tetani 20 Lf Toxoid S. typhi 1050 Mill. Keime, inaktiviert S. paratyphi A 700 Mill. " " " B 700 Mill. " "	o.A.	o.A.	Tetanus Typhus Paratyphus	Regamey, 1944
Ungarn (State Inst. of Publ. Health, Budapest)	C. tetani 5 B.E. Toxoid Typhoid Extrakt 1000 Mill. Keime, inaktiviert (Boivin Mesrobeanu Typ)	Aluminium-hydroxid	subkutan	Tetanus Typhus	Hegyessy, 1956
Jugoslawien	C. tetani Toxoid S. typhi 1000 Mill. Keime, inaktiviert S. paratyphi B 250 Mill. " "	Aluminium-phosphat	o.A.	Tetanus Typhus Paratyphus	Ikic, 1958
England	C. tetani 0,9 ml Toxoid S. typhi 500-1000 Mill. Keime, inaktiviert S. paratyphi A,B u. C 250- 500 Mill. Keime, inaktiviert	o.A.	subkutan	Tetanus Typhus	Rainsford, 1942
Kanada	C. tetani 8 Lf Toxoid Coryneb.diphtheriae 4 Lf Toxoid S. typhi 750 Mill. Keime, inaktiviert S. paratyphi A 250 Mill. " " " B 250 Mill. " "	Aluminium-phosphat	o.A.	Tetanus Diphtherie Typhus	Sellers et al., 1951

I.E. = Internationale Einheiten
Lf = Flockungseinheiten
B.E. = Bindungseinheiten
o.A. = ohne Angaben

Fortsetzung Tabelle 8

Herkunftsland	Zusammensetzung		Adjuvans	Applikation	Indikation	Autor
Rußland	C. tetani Staphylococcus S. typhi S. paratyphi	Toxoid Toxoid Keime, inaktiviert Keime, inaktiviert	aluminium-präzipitert	o.A.	Tetanus Staphylokokken-infektion Typhus Paratyphus	Lepik, 1963
Rußland	C. tetani C. perfringens C. oedematiens C. botulinum A,B und C S. typhi S. paratyphi	Toxoid Toxoid Toxoid Toxoid Keime, inaktiviert Keime, inaktiviert	o.A.	o.A.	Tetanus Gasödem Gasödem Botulismus Typhus Paratyphus	Vygodchikov et al. 1963

o.A. = ohne Angaben

Tabelle 9: Numerisch-additive Kombinationsimpfstoffe mit Tetanus-Toxoid und viralen Antigenen

Impfstoff Herkunftsland	Zusammensetzung	Adjuvans	Applikation	Indikation	Autor
"Tetanol-Virelon" Deutschland (Behringwerke)	C. tetani Toxoid Poliomyelitisvirus Typ 1,2 u. 3 Virus,inaktiviert	Aluminium-hydroxid	intramuskulär	Tetanus Poliomyelitis	Behring Codex, 1964
"Tri-Virelon" Deutschland (Behringwerke)	C. tetani 30 I.E. Toxoid Coryneb.diphtheriae 30 I.E. Toxoid Poliomyelitisvirus Typ 1,2 u. 3 je 10^7 $GKID_{50}$ Virus,inaktiviert	Aluminium-hydroxid	intramuskulär	Tetanus Diphtherie Poliomyelitis	Vogt und Schaudig, 1960 Henigst, 1963
"Quatro-Virelon" Deutschland (Behringwerke)	C. tetani 30 I.E. Toxoid Coryneb.diphtheriae 30 I.E. Toxoid B. pertussis 15 I.O.U. Keime,inaktiviert Poliomyelitisvirus Typ 1,2 u. 3 je 10^7 $GKID_{50}$ Virus,inaktiviert	Aluminium-hydroxid	intramuskulär	Tetanus Diphtherie Keuchhusten	Hennessen et al.,1961 Henigst u. Müller, 1965 Brouwer u. Cohen,1976
Holland (Rijks Inst. voor de Volksgezondheit)	C. tetani 15 Lf Toxoid Coryneb.diphtheriae 5 Lf Toxoid B. pertussis 16 I.O.U. Keime,inaktiviert Poliomyelitisvirus Typ 1,2 u. 3 Virus,inaktiviert	Aluminium-phosphat	o.A.	Tetanus Diphtherie Keuchhusten Poliomyelitis	Brouwer u. Cohen,1976
England	C. tetani 10 Lf Toxoid Coryneb.diphtheriae 25 Lf Toxoid B. pertussis 10×10^9 Keime,inaktiviert Poliomyelitisvirus Typ 1,2 u. 3 Virus,inaktiviert	Aluminium-phosphat	o.A.	Tetanus Diphtherie Keuchhusten Poliomyelitis	Butler et al.,1962
Irland (Glaxo Laboratories)	C. tetani 10 Lf Toxoid Coryneb.diphtheriae 25 Lf Toxoid B. pertussis 20×10^9 Keime,inaktiviert Poliomyelitisvirus Virus,inaktiviert	o.A.	o.A.	Tetanus Diphtherie Keuchhusten	Beale u. Ungar, 1962

Fortsetzung Tabelle 9

Impfstoff Herkunftsland	Zusammensetzung	Adjuvans	Applikation	Indikation	Autor
"Tetravax" USA (Merck Sharp und Dohme)	C. tetani Toxoid Coryneb.diphtheriae Toxoid B. pertussis Keime, inaktiviert Poliomyelitisvirus Virus, inaktiviert	Ka-aluminium-sulfat	o.A.	Tetanus Diphtherie Keuchhusten	Schuchardt et al., 1960
"Quadrigen" USA (Res.Lab.Parke Davis & Co.)	C. tetani 6 I.E. Toxoid Coryneb.diphtheriae 4 I.E. Toxoid B. pertussis 16 P.U. Keime, inaktiviert Poliomyelitisvirus	Aluminium-phosphat	intramuskulär	Tetanus Diphtherie Keuchhusten Poliomyelitis	Barret et al., 1962 Brown et al., 1964
"Compligen" USA	C. tetani Toxoid Coryneb.diphtheriae Toxoid B. pertussis Keime, inaktiviert Poliomyelitisvirus Virus, inaktiviert	Aluminium-phosphat	o.A.	Tetanus Diphtherie Keuchhusten Poliomyelitis	Bordt et al., 1960
Frankreich (Pasteur Inst.)	C. tetani 6,25 I.E. Toxoid Coryneb.diphtheriae 12,5 I.E. Toxoid S. typhi 425 Mill. Keime, inaktiviert S. paratyphi A 150 Mill. Keime, inaktiviert " B 275 Mill. Keime, inaktiviert Poliomyelitisvirus Virus, inaktiviert	o.A.	subkutan	Tetanus Diphtherie Typhus Paratyphus Poliomyelitis	Bernard et al., 1962
Frankreich (Pasteur Inst.)	C. tetani 60 Lf Toxoid Masernvirus Stamm Edmonston 10^3 DICT Virus, inaktiviert	Calcium-phosphat	intramuskulär	Tetanus Masern	Gateff et al., 1973
"Quinto-Virelon" Deutschland (Behringwerke)	C. tetani 30 I.E. Toxoid Coryneb.diphtheriae 30 I.E. Toxoid B. pertussis 4 I.E. Keime, inaktiviert Masernvirus Stamm Marburg 1000 HAE Virus, inaktiviert Poliomyelitisvirus Typ 1,2 u. 3 je 10^7 $GKID_{50}$ Virus, inaktiviert	Aluminium-hydroxid	intramuskulär	Tetanus Diphtherie Keuchhusten Masern Poliomyelitis	Brouwer u.Cohen, 1976 Enders-Ruckle et al., 1966 Henigst u.Müller, 1966

Fortsetzung Tabelle 9

Herkunftsland	Zusammensetzung	Adjuvans	Applikation	Indikation	Autor
Holland (Rijks Inst.voor de Volksgezondheit)	C. tetani 5 Lf Toxoid Coryneb.diphtheriae 15 Lf B. pertussis 16 I.O.U. Keime,inaktiviert Masernvirus Stamm Edmonston 1000 HAE Virus,inaktiviert Poliomyelitisvirus Virus,inaktiviert	Aluminium-hydroxid	intramuskulär	Tetanus Diphtherie Keuchhusten Masern Poliomyelitis	Brouwer u.Cohen, 1976 Ast et al.,1967
Schweiz (Serum und Impfinstitut Bern)	C. tetani Toxoid Coryneb.diphtheriae Toxoid Vaccinia-Virus Virus, lebend	o.A.	intradermal	Tetanus Diphtherie Pocken	Dostal u.Haenzel, 1967
Deutschland	C. tetani (Tetanol^{R} 150 I.E./ml) Toxoid Vaccinia-Virus "Elstree" 0,8 * 10^{8} PFU/o,5 ml Virus, lebend	kein Adjuvans	intradermal	Tetanus Pocken	Stein, 1975

I.E. = Internationale Einheiten
Lf = Flockungseinheiten
I.O.U. = International Opacitiy Units
P.U. = Protective Units
GKID = Gewebe-Kultur-Infekt.-Dosis
HAE = Hämagglutinierende Einheiten

PFU = plaque forming unit

o.A. = ohne Angaben

C EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material und Methoden

1.1. Versuchstiere

Die Versuche wurden mit Mäusen, Ferkeln und Affen durchgeführt. Bei den Mäusen handelte es sich um NMRI Mäuse weiblichen Geschlechts mit einem durchschnittlichen Gewicht von 20 bis 25 Gramm bei Versuchsbeginn. Die Mäuse wurden in Makrolonkäfigen gehalten und mit Pellets und Leitungswasser ad libitum gefüttert.
Die konventionell gehaltenen männlichen und weiblichen Ferkel waren bei Versuchsbeginn 4 bis 6 Wochen alt und erhielten Ferkelstarterfutter und Wasser ad libitum.
Für die Immunisierungsversuche standen außerdem 30 erwachsene Affen der Art Macaca fascicularis beiderlei Geschlechts zur Verfügung. Die Affen wurden jeweils zu zweit in Gitterkäfigen bei der Fa. Reprotox, Münster, gehalten und mit Pellets (Ssniff Alleindiät für Primaten), Obst, Brot und Leitungswasser ad libitum ernährt.

1.2. Impfstoffe

Zur Immunisierung gegen Tetanus verwendeten wir ein mit Formalin inaktiviertes Tetanus-Toxin der Fa. Behringwerke, Marburg. Das Toxoid war gereinigt und enthielt keine Adjuvantien. Der Toxoidgehalt des Konzentrates betrug 1000 Lf/ml. Für vergleichende Untersuchungen wurde ein Tetanus-Adsorbat Impfstoff (Tetanol^{R}) der Fa. Behringwerke eingesetzt. Eine Dosis enthielt in 0,5 ml 75 I.E. Tetanus-Toxoid.

Zur Immunisierung gegen Pocken diente der über Gewebekulturpassagen attenuierte Vaccinia Virusstamm "MVA". Der Stamm geht auf den Dermovaccinia-Stamm "Ankara" zurück, der von Mayr durch 530 kontinuierliche Passagen in primären Hühnerembryofibroblastenkulturen (FHE) modifiziert und über Plaque Passagen selektiert und klonisiert wurde (Hochstein-Mintzel et al. 1972;

Mayr et al. 1975, 1978; Mayr 1976). Zur Impfstoffherstellung wurde das "MVA" Virus auf primären Hühnerembryofibroblastenkulturen vermehrt. Nach Bestimmung des Virusgehaltes der Kultursuspension wurde das Virus bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

In der Kombinationsvaccine wurde Tetanus-Toxoid mit Vaccinia-Virus "MVA" gemischt. Die Antigendosis betrug für die Immunisierung der Mäuse 3,75 Lf Tetanus-Toxoid und ca. $10^{7,0}KID_{50}$ MVA-Virus, der Ferkel 25 Lf Tetanus-Toxoid und ca. $10^{8,0}KID_{50}$ MVA-Virus und der Affen 12 Lf Tetanus-Toxoid und $10^{8,25}KID_{50}$ MVA-Virus.

Folgende Adjuvantien wurden in der Kombinationsvaccine geprüft:

a) Aluminiumhydroxid (Behring Op.Nr. 10568) in einer Konzentration von 0,2%,
b) Mineralöl (Duphar, PD 30-6-80) im Verhältnis 1:1,
c) Kollidon (K-25) in einer Konzentration von 20%,
d) Gelatine in einer Konzentration von 1%,
e) Glukosamin in einer Konzentration von 3% und
f) Liposomen in einer Konzentration von 10%.

Die Liposomen-Vaccine wurde auf folgende Weise hergestellt:

In 1 ml Chloroform wurden 0,073 g L-a-Phosphatidyl-Choline aus Egg yolk, 0,01 g Ch-5-cholesterol und 0,009 g Dicetyl-Phosphat gelöst. Durch Einleiten von Stickstoff wurde anschließend das Chloroform verdampft. Die gelösten Substanzen hefteten sich bei diesem Vorgang an der Gefäßwand an, so daß die Wand mit einem dünnen Film bedeckt war. Dann wurde der Kombinationsimpfstoff in dieses Gefäß gegeben und durch Beschallen (Branson Sonifer, Microtip, Stufe 3A) für 2 bis 3 Minuten die an der Wand haftenden Liposomen im Impfstoff gelöst.

Der Kombinationsimpfstoff wurde flüssig oder lyophilisiert bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Das Lyophilisat wurde mit 1 ml Aqua dest. aufgelöst (= 1 Dosis).

Die Applikation des Impfstoffes erfolgte entweder einmal oder

zweimal im Abstand von 4 Wochen subkutan (Maus) oder intramuskulär (Ferkel, Affe).

1.3. Bestimmung der Kulturinfektiosität des Vaccinia-Virus "MVA"

Die Haltbarkeit der Viruskomponente wurde über den Nachweis der Kulturinfektiosität des Virus in der gelagerten Kombinationsvaccine bestimmt. Dazu wurde der Kombinationsimpfstoff in Zehnerpotenzen verdünnt und pro Verdünnungsstufe jeweils vier Zellkulturröhrchen einer Hühnerembryofibroblastenkultur (FHE) mit je 0,1 ml der Impfstoffverdünnungen beimpft. Die Beimpfung der Kulturen erfolgte 20 bis 24 Stunden nach dem Ansatz. Als Anzuchtmedium diente "Eagles Minimum Essential Medium" mit 10% embryonalem Kälberserum und den üblichen Zusätzen und als Erhaltungsmedium Rinderamnionflüssigkeit mit 1,5% Phenolrot. Die Kontrolle der beimpften Zellkulturen ist lichtmikroskopisch am 6. und 10. Tag post infectionem vorgenommen worden. Als positiv galten Zellkulturen mit virusspezifischer Degeneration und Lysis (Mayr, 1976; Mayr et al. 1978). Die Berechnung des Infektionstiters erfolgte nach der Methode von Spearman-Kärber.

1.4. Aktiver Mäuseschutzversuch

14 Tage nach der Erst- oder Zweitimpfung mit der Kombinationsvaccine wurden geimpfte und nicht geimpfte Mäuse (Kontrollen) mit dem neurovirulenten Vaccinia-Virusstamm "M_1" intraperitoneal bzw. mit C. tetani Toxin subkutan, belastet. Die Belastungsdosis betrug pro Maus $10^{5,5} KID_{50}$ Vaccinia-Virus bzw. 10 LD_{50} Tetanus-Toxin. Die Beurteilung erfolgte über den Vergleich der Morbiditätsraten (Pocken) oder Mortalitätsraten (Tetanus) bei den geimpften und nicht geimpften Mäusen. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über 10 Tage.

1.5. Blutentnahme

Die Blutentnahme an den immunisierten Versuchstieren erfolgte vor und zu verschiedenen Zeiten nach der Impfung. Bei den Mäusen wurde das Blut durch Dekapitation gewonnen, bei den Ferkeln aus der Vena jugularis und bei den Affen aus der Vena femoralis, nachdem die Affen mit 0,5 bis 0,8 ml Vetalar^{R} betäubt worden waren. Das Blut wurde über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag bei 3000 UpM zentrifugiert. Die Lagerung der Sera erfolgte bis zur Weiterverwendung bei -20°C. Alle Seren wurden vor der Durchführung der Tests bei 56°C im Wasserbad inaktiviert.

1.6. Antitoxinbestimmung gegen Tetanus

1.6.1. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Der ELISA zum Nachweis der Tetanus-Antitoxine wurde im Mikroverfahren durchgeführt. Als Antigen zur Beschichtung der Mikrotiterplatten diente dasselbe Toxoid wie zur Immunisierung. Die Antigengebrauchsverdünnung in Karbonat/Bikarbonatpuffer (pH 9,6) lag bei 1:10 000 = 0,1 Lf/ml Tetanus-Toxoid. 0,1 ml der Antigenverdünnung wurde in die Vertiefungen der Flachbodenplatten (M 129 A, Flow Laboratories, Bonn) pipettiert. Die Platten wurden anschließend 3 Stunden bei 37°C inkubiert, mit Tesafilm verschlossen und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit NaCl-Phosphatpuffer plus Tween (8 g NaCl + 0,2 g KH_2PO_4 + 2,9 g Na_2HPO_4 x 12 H_2O + 0,2 g KCl pro 1 l Aqua dest. + 0,05% Tween 20) beschickten wir die Vertiefungen mit je 0,1 ml der in Zweier-Stufen mit NaCl-Phosphat plus Tween verdünnten Sera. Zur Kontrolle liefen jeweils ein positives und ein negatives Serum mit. Nach einstündiger Bebrütung bei 37°C wuschen wir die Platten viermal und beschickten sie mit je 0,1 ml der Gebrauchsverdünnungen (in NaCl-Phosphat ohne Tween, mit 5% foetalem Kälberserum) des tierartspezifischen Konjugates. Es handelte sich dabei um Peroxidase-anti-porcine-Konjugat der Fa. Miles Yeda (Gebrauchsverdünnung von 1:500),

Peroxidase-anti-monkey-Konjugat der Fa. Nordic (Gebrauchsverdünnung 1:4000) und ein Anti-mouse-Konjugat der Fa. Nordic (Gebrauchsverdünnung 1:400). Nach erneuter einstündiger Inkubation bei 37°C und viermaligem Waschen erfolgte die Zugabe von je 0,1 ml Substrat (0,5 g p-Phenyl-diamin der Fa. Sigma, München, + 4,67 g Zitronensäure + 9,15 g Na_2HPO_4 pro 1 l Aqua dest., kurz vor Gebrauch Zugabe von 0,005% H_2O_2). Die Platten wurden etwa 10 Minuten im Mikro-Shaker (Dynatech) geschüttelt und bis zur Ablesung bei 510 nm im Multiscan-Photometer (Flow Laboratories, Bonn) eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert.

1.6.2. Indirekte Hämagglutination:

Als Antigen fand das gleiche Tetanus-Toxoid wie zur Immunisierung Verwendung. Zur Sensibilisierung der Erythrozyten wurde ein Volumen einer 10%igen Hammelerythrozytensuspension mit zwei Volumen Tetanus-Toxoid (1000 Lf/ml) und einem Volumen einer 1%-igen Glutaraldehydlösung gemischt und zwei Stunden bei 37°C im Wasserbad bebrütet. Anschließend wurden die Hammelerythrozyten dreimal in PBS gewaschen und auf eine Konzentration von 0,5 Prozent eingestellt. Von den Mäuseseren legten wir eine Verdünnungsreihe in 2er Potenzen mit 0,3 ml Serum an. Zu jeder Verdünnungsstufe wurden 0,3 ml sensibilisierte Erythrozyten pipettiert. Nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Gemische 18 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Anschließend erfolgte die Ablesung.

1.7. Antikörperbestimmung gegen Pocken

1.7.1. Hämagglutinationshemmungstest

Der Test wurde im Mikroverfahren durchgeführt. Als Testantigen dienten die Vaccinia-Stämme "Bern", "M_1" und "MVA". Die zu untersuchenden Seren wurden nach Vorbehandlung mit 10%igen Hühnererythrozyten mit physiologischer Kochsalzlösung in 2er Potenzen verdünnt (Volumen 0,025 ml). Zu jeder Verdünnungsstufe

wurde das gleiche Volumen Vaccinia Virus-Hämagglutinin (4 HAE[1]), das aus Chorioallantoismembranen gewonnen wurde, hinzugefügt und die Gemische bei 37°C inkubiert. Nach einer Stunde wurden 0,025 ml 1%ige Hühnererythrozyten zu jedem Serum-Virus-Gemisch pipettiert und die Gemische nochmals 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Ablesung. Entsprechende Serum- und Antigenkontrollen liefen parallel.

1.7.2. Neutralisationstest

Die Bestimmung neutralisierender Antikörper gegen Pocken erfolgte in Zellkulturröhrchen und in Mikrotiterplatten.

a) Durchführung der Makromethode:

Der Neutralisationstest wurde nach der Serumverdünnungsmethode in primären Hühnerembryofibroblastenkulturen (Einsaat 500 000/ml) durchgeführt. Als Testvirus benutzten wir die Vaccinia-Stämme "Bern", "M_1" und "MVA". Die konstante Virusmenge betrug ca. 100 KID_{50}. Als Anzuchtmedium verwendeten wir "Eagles Minimal Essential Medium" mit 7% foetalem Kälberserum, 10% Lactalbumin, 1% Natriumbikarbonat und Antibiotika (Penicillin, Streptomycin) je 0,1 ml pro 100 ml Medium. Zur Durchführung des Testes wurden die Sera in 2er Potenzen verdünnt und zu jeder Verdünnungsstufe die gleiche Menge Virus und 5% Meerschweinchenkomplement pipettiert. Nach zweistündiger Inkubation der Gemische bei 37°C im Wasserbad wurden pro Serumverdünnungsstufe vier Zellkulturröhrchen, die zuvor mit Erhaltungsmedium (Rinderamnionflüssigkeit mit 1,5% Phenolrot) gewechselt wurden, mit jeweils 0,2 ml beimpft. Als Bewertungsgrundlage diente der cythopathische Effekt innerhalb von 10 Tagen Beobachtungszeit. Die Auswertung erfolgte nach der Methode von Spearman-Kärber.

b) Durchführung der Mikromethode:

Beim Mikroverfahren wurden die Sera in 2er Stufen mit

---

1) Hämagglutinierende Einheit

Hilfe von genormten Mikrodilutern (Fa. Flow) im Zellkulturmedium, bestehend aus Eagles Minimal Essential Medium mit 10% foetalem Kälberserum, 10% Laktalbumin, 1% Natriumbikarbonat und Antibiotika, verdünnt. Vier Vertiefungen der Mikrotiterplatten (Fa. Becton Dickinson & Co., Falcon^{R} 3040) wurden mit jeder Serumverdünnung beschickt und anschließend 0,025 ml 5%iges Meerschweinchenkomplement und 0,025 ml Vaccinia-Virus "Bern" (100 KID_{50}) zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 37°C erfolgte die Einsaat von primären Hühnerembryofibroblastenzellen, und zwar pro Loch 0,025 ml einer Zellsuspension mit 800 000 Zellen pro ml. Die Platten wurden mit einer Folie abgedeckt und unter CO_2-Spannung bebrütet. Die mikroskopische Endablesung anhand des cytopathischen Effektes erfolgte am 6. Tag post infectionem. Der Antikörpertiter wurde nach der Methode von Spearman-Kärber berechnet.

Der Mikroneutralisationstest erwies sich als gut reproduzierbar und im Vergleich zur Makromethode als material- und zeitsparender. Die Ergebnisse des Mikrotests waren mit denen des Makrotests absolut vergleichbar. Ein Nachteil lag darin, daß einige Seren wegen ihrer Toxizität in niedrigen Verdünnungsstufen (1:2 bis 1:8) nicht ausgewertet werden konnten.

1.8. Intrakutantest

Der Intrakutantest wurde vier Wochen nach der zweiten Immunisierung durchgeführt. Als Antigen diente "MVA"-Virus (Ausgangstiter: $10^{8,75}KID_{50}$/ml), das mit physiologischer Kochsalzlösung in 2er Stufen (1:2 - 1:128) verdünnt wurde. Als Applikationsstelle wählten wir die Halsseite der Tiere. Diese wurde zuvor gereinigt und die Injektionsstellen im Abstand von ca. 3 cm markiert. Von jeder Virusverdünnung, einschließlich dem un-

verdünntem "MVA"-Virus, impften wir intrakutan, mittels Tuberkulinnadel, je 0,1 ml in die vorgezeichneten Markierungspunkte.

Die Ablesung der Reaktionen fand sofort, 4, 24, 48 und 72 Stunden nach der intrakutanen Applikation statt. Die Bewertung der Hautreaktionen erfolgte nach folgenden Gesichtspunkten:
Das Auftreten einer Schwellung an der Injektionsstelle wurde mit + , eine zusätzliche Rötung um die Einstichstelle mit ++ bezeichnet.

2. Ergebnisse

2.1. Untersuchungen zur Wirksamkeit der Kombinationsvaccine "Pocken-Tetanus" bei Mäusen

Zuerst wurde am Mäusemodell die Frage der kombinierten Immunisierung gegen Tetanus und Pocken untersucht. Dazu impften wir jeweils eine Gruppe von Mäusen einmal mit Tetanus-Toxoid und Vaccinia-Virus allein und eine dritte Gruppe kombiniert mit Tetanus-Toxoid und Vaccinia-Virus. Die Wirksamkeit der verschiedenen Impfstoffe wurde durch den Vergleich der Morbiditäts- bzw. Mortalitätsraten nach der Testinfektion bzw. Toxinbelastung und durch den post-vaccinalen Antikörperanstieg beurteilt. Die Ergebnisse der aktiven Mäuseschutzversuche und der Antikörperbestimmungen sind im einzelnen in Tabelle 1 dargestellt.

24 Tage post vaccinationem waren die einmal mit Tetanus-Toxoid geimpften Mäusegruppen und die mit Tetanus-Toxoid und MVA Virus geimpfte Gruppe vollkommen gegenüber einer Belastung mit 10 LD_{50} Tetanus-Toxin geschützt. Die nur mit Vaccinia-Virus geimpften Tiere (Negativ-Kontrolle) starben dagegen alle spezifisch an der Toxinwirkung. Es blieb für die Schutzwirkung des Tetanus-Toxoids gleichgültig, ob es allein oder gemeinsam mit dem Vaccinia-Virus appliziert wurde.

Die in der indirekten Hämagglutination gemessenen mittleren Antitoxintiter gegen Tetanus erreichten bei monovalenter Tetanus-Impfung 24 Tage nach der Impfung Werte von 1:256. Bei der Impfung mit der Kombinationsvaccine waren die gemessenen Antitoxintiter etwas niedriger. Sie lagen 24 Tage nach der Impfung bei 1:64.

Zur Prüfung der Pockenimmunität wurden die Mäuse mit $10^{5,5}KID_{50}$ des neurovirulenten Vaccinia-Stammes M_1 belastet. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich wird, waren 24 Tage nach der Impfung sowohl die mit Tetanus-Toxoid und Vaccinia-Virus gemeinsam, als auch die mit Vaccinia-Virus allein immunisierten Tiere geschützt, während die monovalent, mit Tetanus-Toxoid immunisierten Mäuse (Kontrolle) alle erkrankten (Morbiditätsindex bei 100%).

Auch bei den postvaccinalen Neutralisationstitern gegen das Vaccinia-Virus ließ sich praktisch kein Unterschied zwischen der alleinigen Impfung mit MVA-Virus und der kombinierten Impfung mit Tetanus-Toxoid feststellen. Die Neutralisationstiter stiegen in der mit dem Vaccinia-Virus geimpften Gruppe auf 1:110 und in der kombiniert geimpften Gruppe auf 1:90 am 24. Tag nach der Impfung.

Die ersten Untersuchungen bei der Maus haben bewiesen, daß eine kombinierte Impfung mit Tetanus-Toxoid und Vaccinia-Virus "MVA" möglich ist, ohne daß ein wesentlicher Wirksamkeitsverlust bei einer der beiden Komponenten auftritt.

Für die ersten richtungsweisenden Versuche wurde ein Kombinationsimpfstoff verwendet, der außer den beiden Antigenen keine Zusätze enthielt. Für den Praxiseinsatz ist es notwendig, dem Impfstoff Adjuvantien zuzugeben, um die Wirksamkeit und Stabilität des Impfstoffes zu verbessern. In weiteren Untersuchungen bei der Maus testeten wir die Immunogenität der Kombinationsvaccine nach Zugabe der bekannten wirksamkeitssteigernden Zusätze Aluminiumhydroxid, Mineralöl und Liposomen, sowie der stabilisierenden Substanz Kollidon. Einen Überblick über die postvaccinalen Antikörpertiter bei den verschiedenen Gruppen 14 Tage nach der Impfung gibt Tabelle 2.

Die Tetanus-Antitoxintiter der Mäuse lagen 14 Tage nach der Impfung mit der Kombinationsvaccine ohne Adjuvans bei 1:32. Dieser Wert ließ sich durch Zusatz von Adjuvantien zum Impfstoff wesentlich steigern und zwar auf 1:512 ($Al(OH)_3$), (Liposomen) bzw. 1:256 (Mineralöl). Keine Verbesserung, aber auch keine Verschlechterung des Ergebnisses brachte der Zusatz von Kollidon.

Bezüglich der Pockenimmunität ergab sich dagegen ein vollkommen anderes Bild. Das Ergebnis der einfachen Kombinationsvaccine konnte durch den Zusatz von Adjuvantien nicht verbessert werden, im Gegenteil, das Immunisierungsergebnis der Adjuvansvaccinen war zum Teil wesentlich schlechter als das der Vaccinen ohne Adjuvans. Die unbefriedigende Wirksamkeit der Adjuvans-Vaccinen

ergibt sich aus den Ergebnissen der Virustitrationen mit den kompletten Vaccinen. Während die Mischung des Vaccinia-Virus nur mit Tetanus-Toxoid zu keiner Inaktivierung des Virusanteils führte, wurde nach Hinzufügung der anderen Adjuvantien zur Vaccine ein mehr oder minder starker Titerabfall festgestellt. Bei der Liposomenvaccine war keine Virustitration möglich, da das Vaccinia-Virus durch die Liposomen ummantelt und dadurch die Virusaktivität verschleiert wurde.

2.2. Untersuchungen zur Wirksamkeit der Kombinationsvaccine "Pocken-Tetanus" bei Ferkeln

Nachdem die Untersuchungen bei der Maus erfolgreich waren, dehnten wir die Versuche auch auf das Schwein aus. Das Schwein hat gegenüber der Maus den Vorteil, daß einmal der Impfstoff intramuskulär verabreicht werden kann und zum anderen serologische Verfolgungsuntersuchungen möglich sind. In Tabelle 3 sind die Antikörpertiter von Ferkeln zusammengestellt, die zweimal im Abstand von 4 Wochen entweder allein oder kombiniert mit Tetanus-Toxoid und Vaccinia-Virus "MVA" intramuskulär immunisiert wurden. Der Kombinationsimpfstoff kam sowohl vor wie nach der Gefriertrocknung zur Prüfung, wobei dem gefriergetrockneten Impfstoff einmal als Adjuvantien Gelatine und Glukosamin zugesetzt wurden. Beim Tetanus-Impfstoff handelte es sich einmal um reines Toxoid, wie es in der Kombinationsvaccine enthalten ist, und zum anderen um einen handelsüblichen Tetanus-Impfstoff (Tetanol^{R}).

Die Antikörpertiter gegen das Vaccinia-Virus waren nach einmaliger Impfung bei allen Impfstoffen in einem relativ niedrigen Bereich. Nach der Boosterimpfung stiegen die Titer an und zwar bei den mit dem Kombinationsimpfstoff geimpften Tieren etwas weniger als bei den mit dem Einfachimpfstoff immunisierten Tieren. Die Gefriertrocknung der Kombinationsvaccine sowie der Zusatz von Gelatine und Glukosamin wirkten sich nicht nachteilig auf die Immunogenität des Vaccinia-Virus aus.

Die Ergebnisse der Tetanus-Schutzimpfung waren nicht so einheitlich zu bewerten. Das beste Ergebnis hatten die nur mit Tetanus-Toxoid geimpften Ferkel. Unwesentlich schwächer waren die Antitoxintiter der Ferkel, die mit dem lyophilisierten Kombinationsimpfstoff mit Gelatine und Glukosamin immunisiert wurden. Tetanus-Impfstoffe ohne diese Adjuvantien stimulierten vor allem eine wesentlich schwächere Boosterreaktion. Die Antitoxintiter waren in diesen Gruppen um das 5- bis 10-fache niedriger als in der "Tetanol-Gruppe".

Die von uns entwickelte Kombinationsvaccine gegen Tetanus und Variola enthält als Pockenkomponente den attenuierten Vaccinia-Virusstamm "MVA". Für die Wirksamkeitsbeurteilung des Pockenimpfstoffes war es wichtig zu wissen, inwieweit es nach Immunisierung mit diesem Impfstamm zur Ausbildung einer Kreuzimmunität gegen andere, nicht attenuierte Vaccinia-Virusstämme kommt. Zur Feststellung der Kreuzimmunität impften wir Ferkel zweimal mit der Kombinationsvaccine und bestimmten anschliessend die Antikörpertiter im Neutralisations- und Hämagglutinationshemmungstest, und zwar sowohl gegen den homologen Vaccinia-Stamm "MVA" als auch gegen die heterologen Stämme "Bern" und "M_1". Die Ergebnisse der Antikörpertitrationen sind im einzelnen in Tabelle 4 zusammengestellt.

Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, lag der Neutralisationstiter gegenüber dem homologen "MVA"-Stamm etwa doppelt so hoch wie gegenüber den heterologen Stämmen "Bern" und "M_1". Die Neutralisationstiter betrugen im einzelnen 1:130 (MVA) bzw. 1:54 (Bern) und 1:45 (M_1). Im Gegensatz zu den Neutralisationstitern waren die HAH-Titer bei allen 3 Stämmen etwas niedriger. Der höchste HAH-Titer von 1:64 wurde gegenüber dem heterologen Stamm "Bern" gemessen, während die Titer gegenüber dem homologen "MVA" und dem hereologen "M_1"-Stamm einheitlich 1:32 betrugen. Die festgestellten Unterschiede in beiden Tests sind aber nicht signifikant und liegen im Toleranzbereich.

Um die zelluläre Immunität zu testen, wurden vier weitere Ferkel zweimal im Abstand von vier Wochen mit der lyophilisierten

Kombinationsvaccine "Tetanus-Pocken" mit Gelatine und Glukosamin immunisiert. Vier Wochen nach der 2. Impfung wurde den Tieren je 0,1 ml "MVA"-Virus (Titer $10^{8,75}KID_{50}$/ml) in Verdünnungen von 1:2 bis 1:128 intrakutan an der Halsseite appliziert. Kutane Reaktionen und der zum Zeitpunkt des Intrakutantests gemessene Antikörpertiter gegen Pocken der Versuchstiere sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Bereits vier Stunden nach Applikation des "MVA"-Virus wurden bei 2 Tieren Reaktionen an der Impfstelle in Form von Schwellungen und Rötungen bis zu einer Verdünnung von 1:8 beobachtet. Zwei Tiere reagierten nur an der Injektionsstelle des unverdünnten "MVA"-Virus. Nach 24 Stunden zeigte ein Tier noch kutane Reaktionen bis zur Verdünnung 1:8, zwei Tiere bis zur Verdünnung 1:4 und ein Tier reagierte wiederum nur an der 1. Injektionsstelle (unverdünntes "MVA"-Virus). Drei Tage nach der intrakutanen Applikation des "MVA"-Virus waren keine Veränderungen an den Injektionsstellen mehr erkennbar.

Zwischen den Titern der humoralen Antikörper, die mit dem Hämagglutinationshemmungstest und dem Neutralisationstest bestimmt wurden, und der Stärke der Hautreaktionen des Intrakutantestes war kein Zusammenhang erkennbar.
Obwohl die Ferkel keine geeigneten Versuchstiere für eine kutane Sensibilisierung sind, beweisen die Ergebnisse dennoch, daß mit dem Kombinationsimpfstoff "Pocken-Tetanus" auch eine zelluläre Immunität hervorgerufen wird.

2.3. Untersuchungen zur Wirksamkeit der Kombinationsvaccine "Pocken-Tetanus" bei Affen

Für die Wirksamkeitsprüfung an Affen wurde der lyophilisierte Kombinationsimpfstoff "Pocken-Tetanus" mit Glukosamin und Gelatine herangezogen. Dieser Impfstoff schnitt in den Ferkelversuchen mit Abstand am besten ab. Die Impfung erfolgte intramuskulär, und zwar zweimal im Abstand von vier Wochen. Der Nachweis der Pocken-Antikörper erfolgte mit dem Mikroneutralisationstest und dem Hämagglutinationshemmungstest, und der Nachweis der

Tetanus-Antitoxine mit dem ELISA. Einen Überblick über die Ergebnisse der Antikörperuntersuchungen gibt Tabelle 6.

Bei keinem der Tiere konnten vor der Impfung humorale Antikörper weder gegen Pocken noch gegen Tetanus nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Antikörperbestimmung bei den Affenseren stimmten mit denen der Ferkel im wesentlichen überein. Vier Wochen nach der ersten Impfung betrug der mittlere Antitoxintiter gegen Tetanus im ELISA 1:10. Dieser niedrige Antitoxintiter stieg bis zur 2. Woche nach der Revaccination auf 1:200 an. Vier Wochen nach der Revaccination war ein leichter Abfall des Tetanus-Antitoxintiters auf 1:152 festzustellen.

Die im ELISA gemessenen Antitoxintiter gegen Tetanus sind für die Beurteilung der Stärke einer Immunreaktion geeignet. Über den Schutzwert eines Serums gegenüber Tetanus-Toxin sagen die reinen ELISA-Titer zunächst nichts aus. Eine Aussage über die toxinneutralisierende Wirkung, die in Internationalen Einheiten (I.E.) ausgedrückt wird, war bisher nur über den Mäuseschutztest möglich. Für die Bestimmung der Internationalen Einheiten kann aber auch der ELISA-Titer herangezogen werden, wenn die im ELISA gemessenen Antitoxine anhand einer Eichkurve umgerechnet werden. Die Eichkurve wurde mit einem Standardserum, das einen bekannten Gehalt an Internationalen Einheiten enthielt, aufgestellt. Abbildung 1 zeigt die anhand der ELISA-Ergebnisse mit einem Standardserum, das 10 Internationale Einheiten Antitoxin enthielt, erstellte Eichkurve. Zur Berechnung der Kurve wurden die Antitoxinverdünnungen des Referenzserums auf der Abszisse und die im Photometer gemessenen Extinktionswerte der einzelnen Verdünnungsstufen auf der Ordinate linear aufgetragen. Durch die Verbindung der auf der Ordinate aufgetragenen Extinktionswerte des zu untersuchenden Serums mit den auf der Abszisse aufgetragenen Antitoxintitern des Standardserums ließ sich dann der Antitoxingehalt eines unbekannten Serums in Internationalen Einheiten bestimmen (Stiffler-Rosenberg und Fey 1977; Frühwein und Hochstein-Mintzel 1980; Fey und Stiffler-Rosenberg 1977).

Der auf diese Weise ermittelte Tetanus-Antitoxingehalt der

Affensera betrug 2 Wochen nach der Zweitimpfung 11 I.E. und 4 Wochen nach der Zweitimpfung 5 I.E.. Damit lag der Antitoxingehalt der Affensera nach der Zweitimpfung deutlich über der von der WHO angegebenen Schutzschwelle von 0,01 I.E. Antitoxin pro Milliliter Serum.

Der mittlere, in der Hämagglutinationshemmungsreaktion gemessene Antikörpertiter gegen Vaccinia-Virus stieg nach der Erstimpfung zunächst nur auf 1:6 an. Zwei Wochen nach der Revaccination kam es zu einem weiteren Anstieg des Titers auf 1:28, der dann vier Wochen post revaccinationem auf 1:12 abfiel. Der Neutralisationstiter lag vier Wochen nach der Erstimpfung bei 1:7. Dieser Ausgangstiter stieg nach der Revaccination sehr stark an, und zwar auf 1:215 (2 Wochen post revacc.) bzw. 1:125 (4 Wochen post revacc.).

2.4. Untersuchungen zur Unschädlichkeit der Kombinationsvaccine "Pocken-Tetanus" bei Mäusen, Ferkeln und Affen

Der Kombinationsimpfstoff wurde bei Mäusen nach subkutaner und bei Ferkeln und Affen nach intramuskulärer Applikation auf seine Unschädlichkeit geprüft. Als Wertmesser für die Unschädlichkeit galten Fieberreaktionen, Allgemeinbefinden (Freßlust, Verhalten, Gewichtsentwicklung) und das Auftreten von Lokalreaktionen. Bei keinem Tier wurden post vaccinationem bzw. revaccinationem Fieber oder Störungen des Allgemeinbefindens beobachtet.

Einen Überblick über die Impfreaktionen bei den 30 immunisierten Affen gibt Tabelle 10. Bei den Affen stellten sich nach der Erstimpfung vereinzelt Rötungen bzw. leichte Schwellungen an der Injektionsstelle ein, die aber 1 bis 2 Tage post vaccinationem wieder verschwanden.

2.5. Untersuchungen zur Haltbarkeit der Kombinationsvaccine "Pocken-Tetanus"

Die Haltbarkeit einer Kombinationsvaccine richtet sich immer nach der schwächsten Antigenkomponente. Da in der Kombinationsvaccine "Pocken-Tetanus" die Viruskomponente wesentlich empfindlicher ist als das Tetanus-Toxoid, konzentrierten sich die Untersuchungen zur Haltbarkeit der Kombinationsvaccine auf das Vaccinia-Virus "MVA". Zur Prüfung der Haltbarkeit wurde die komplette lyophilisierte Kombinationsvaccine (Charge I/81) a) bei 37°C im Brutschrank, b) bei Zimmertemperatur (ca. 22°C), c) bei 4°C im Kühlschrank und d) bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Nach verschiedenen Zeitabständen erfolgte die Bestimmung des Infektionstiters des im Impfstoff enthaltenen Vaccinia-Virus "MVA".
Einen Überblick über die Vaccinia-Virus-Titer der bei den verschiedenen Temperaturen unterschiedlich lange gelagerten Kombinationsvaccine gibt Tabelle 8. In Abbildung 2 sind die Ergebnisse zusätzlich graphisch dargestellt.
Zum Vergleich wurde in Tabelle 8 der Infektionstiter eines monovalenten, lyophilisierten "MVA"-Impfstoffes, ohne Zusätze, mitaufgeführt.

Der Ausgangsvirusgehalt in der frisch hergestellten lyophilisierten Kombinationsvaccine betrug $10^{8,25}KID_{50}$/ml. Bei einer Lagerung der Kombinationsvaccine bei 37°C fiel der Virustiter relativ rasch ab und lag nach 32 Tagen bereits unter der nachweisbaren Grenze. Bei einer Lagerungstemperatur von 22°C (Zimmertemperatur) war nach 8 Tagen schon ein Titerabfall um eine Zehnerpotenz feststellbar. Der Titer von ca. $10^{7,00}KID_{50}$ persistierte dann etwa bis zum 51. Tag der Lagerungsperiode. Erst ab dem 63. Tag sank der Virustiter weiter kontinuierlich ab und erreichte einen Wert von $10^{5,00}KID_{50}$ am 163. Tag. Erheblich empfindlicher auf die Temperaturen von 37°C und 22°C reagierte der monovalente lyophilisierte "MVA"-Impfstoff ohne Zusätze. Bei einer Lagerungstemperatur von 37°C sank der Virustiter schon nach 14 Tagen auf $10^{1,75}KID_{50}$/ml. Nach 163-tägiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur war noch ein Virustiter von $10^{2,25}KID_{50}$ nachweisbar.

Die Ergebnisse der Virustitration nach Lagerung der Kombinationsvaccine bei Kühlschrank- bzw. Gefrierschranktemperatur waren wesentlich günstiger. Im Kühlschrank wurde bis zum 63. Tag kein Abfall des Virusgehaltes in der Kombinationsvaccine festgestellt. Selbst nach 220-tägiger Lagerung bei 4°C ließ sich noch ein KID_{50}-Wert um $10^{7,50}$ feststellen. Der Virustiter des monovalenten "MVA"-Impfstoffes ohne Zusätze war mit $10^{7,00}KID_{50}$ dagegen etwas niedriger. Zum selben Zeitpunkt lag der Virustiter der bei -20°C gelagerten Kombinationsvaccine noch bei $10^{7,75}KID_{50}$ und damit nur unwesentlich unter dem Ausganswert von $10^{8,25}KID_{50}$.
Die wesentlich besseren Ergebnisse der Virustitration mit der Kombinationsvaccine, vor allem bei den Lagerungstemperaturen von 37°C und 22°C, beweisen, daß den Zusätzen Glukosamin und Gelatine ein stabilisierender Effekt auf das Vaccinia-Virus zugesprochen werden kann.

Tab. 1: Immunisierungsergebnis bei Mäusen, die entweder allein oder kombiniert gegen Pocken und Tetanus geimpft wurden

Impfstoff	Immunisierungsergebnis[3] (24 Tage p.vacc.)			
	Pocken		Tetanus	
	Antikörper-titer[1]	Morbidität p. chall.[4]	Antitoxin-titer[2]	Mortalität p. chall.[5]
Tetanus-Toxoid (2 Lf)	-	100%	1:256	0%
Tetanus-Toxoid + MVA-Virus	1: 90	30%	1: 64	0%
MVA-Virus ($10^{7,3}$ KID_{50})	1:110	20%	-	100%

[1] Neutralisationstest
[2] indirekte Hämagglutination
[3] pro Gruppe 30 Tiere
[4] Challenge mit Vaccinia-Virus "M_1" (10^5 pro Tier)
[5] Challenge mit 10 LD_{50} Tetanus-Toxin

Tab. 2: Einfluß verschiedener Adjuvantien auf die Antikörperbildung nach Schutzimpfung mit der Kombinationsvaccine Pocken/Tetanus bei der Maus

Impfstoff			Mittlere Antikörpertiter[3] (14 d p. vacc.)	
Antigen	Adjuvans	Virusgehalt/ml (KID_{50})	Vaccinia-Virus 1)	Tetanus[2]
Vaccinia-Virus "MVA" + Tetanus-Toxoid (2 Lf)	ohne	$10^{8,5}$	1:90	1: 32
	Al $(OH)_3$	$10^{6,75}$	1:16	1:512
	Mineralöl	$10^{7,0}$	1:38	1:256
	Liposomen	n.d.[4]	1:59	1:512
	Kollidon	$10^{7,5}$	1:69	1: 64

1) Neutralisationstest

2) indirekte Hämagglutination

3) n=20

4) Virustitration nicht möglich

Tab. 3: Antikörperbildung bei Ferkeln, die allein oder kombiniert gegen Pocken und Tetanus immunisiert wurden

Antigen	Form	Adjuvans	Mittlere Antikörpertiter (geom.Mittel[1])			
			4 Wo. p. vacc.		2 Wo. p. revacc.	
			Pocken[2]	Tetanus[3]	Pocken[2]	Tetanus[3]
Tetanus-Toxoid (12 Lf)	flüssig	ohne	-	1:14	-	1: 64
Vaccinia-Virus ($10^{8,25}KID_{50}$)	flüssig	ohne	1:8	-	1:110	-
Tetanus-Toxoid (12 Lf) + Vaccinia-Virus ($10^{8,25}KID_{50}$)	flüssig	ohne	1:4	neg.	1:210	1: 32
	lyophilisiert	ohne	1:6	neg.	1:164	1: 24
	lyophilisiert	Gelatine(1%) Glukosamin (3%)	1:9	1: 8	1:200	1:220
Tetanol[R]	flüssig	$Al(OH)_3$	-	1:32	-	1:360

[1] n = 8 [2] Neutralisationstest [3] ELISA

Tab. 4: Mittlere Antikörpertiter gegen 3 unterschiedliche Vaccinia-Virusstämme (Bern, M_1, MVA) bei Ferkeln, die zweimal intramuskulär mit der Kombinationsvaccine Pocken/Tetanus immunisiert wurden

Impfstoff	Antikörper-nachweismethode	Mittlere Antikörpertiter [1]		
		Stamm "MVA"	Stamm "Bern"	Stamm "M_1"
Vaccinia-Virus "MVA" + Tetanus-Toxoid (ohne Zusätze)	Neutralisationstest (NT)	1:130	1:54	1:45
	Hämagglutinationshemmungstest (HAH)	1: 32	1:64	1:32

[1] 2 Wochen p. revacc.

Tabelle 5: Intracutantest bei Ferkeln gegen Pocken, die mit einer lyophilisierten Tetanus-Pocken-Kombinationsvaccine (Charge I/81) immunisiert wurden

Versuchstier Nr.	Antikörper titer 2)		Ergebnis des Intracutantestes bei verschiedenen Verdünnungen des Virusmaterials 1)							
	MNT	HAH	Ablesung nach 4 Stunden				Ablesung nach 24 Stunden			
			unverdünnt	1:2	1:4	1:8	unverdünnt	1:2	1:4	1:8
1	1:215	1: 4	+	neg	neg	neg	+	neg	neg	neg
2	1:512	1: 4	+	+	+	+	++	++	++	neg
3	1:304	1: 16	++	++	++	++	++	++	++	neg
4	1:181	1: 8	++	neg	neg	neg	++	++	++	++

1) Ausgangstiter $10^{7,25}$ MVA-Virus pro 0,1 ml

2) nach 2 Impfungen im Abstand von vier Wochen

MNT = Mikroneutralisationstest

HAH = Hämagglutinationshemmungstest

Tabelle 6: Mittlere Antikörpertiter bei Affen, die zweimal mit dem Kombinationsimpfstoff "Pocken-Tetanus" (Charge I/81) immunisiert wurden

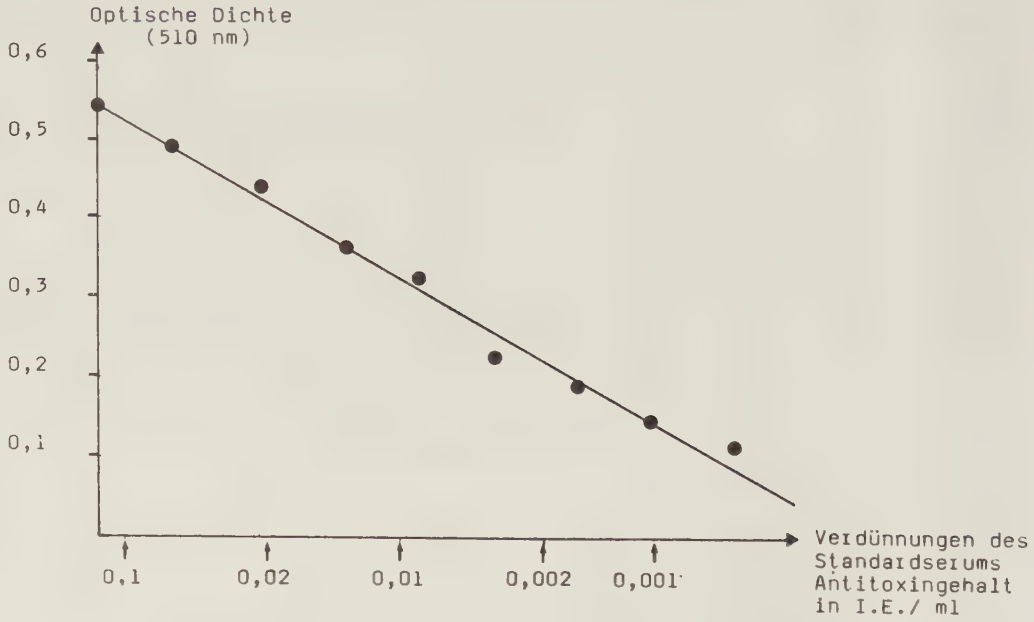
Impfstoff (lyophilisiert)	Nachweisverfahren[2]		Mittlere Antikörpertiter (geom.Mittel[1])			
			vor der Impfung	4 Wochen[3] p.vacc.	2 Wochen p.revacc.	4 Wochen p.revacc.
Tetanus-Toxoid(12Lf) Vaccinia-Virus "MVA" ($10^{8,25}KID_{50}$) Gelatine (1%) Glukosamin (3%)	Pocken	MNT	neg.	1: 7	1:215	1:125
		HAH	neg.	1: 6	1: 28	1: 13
	Tetanus	ELISA	neg. <0,01 I.E.	1: 10 0,7 I.E.	1:200 11 I.E.	1:152 5 I.E.

[1] n = 10

[2] MNT = Mikroneutralisationstest
HAH = Hämagglutinationshemmungstest
ELISA = Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

[3] Zeitpunkt der Revaccination

Abb. 1: ELISA-Eichkurve, erstellt mit einem Standardserum, zur Berechnung des Tetanus-Antitoxingehaltes eines unbekannten Serums



Tab. 7: Klinische Beobachtungen bei Affen, die mit einer Pocken-Tetanus-Kombinationsvaccine (Charge I/81) immunisiert wurden

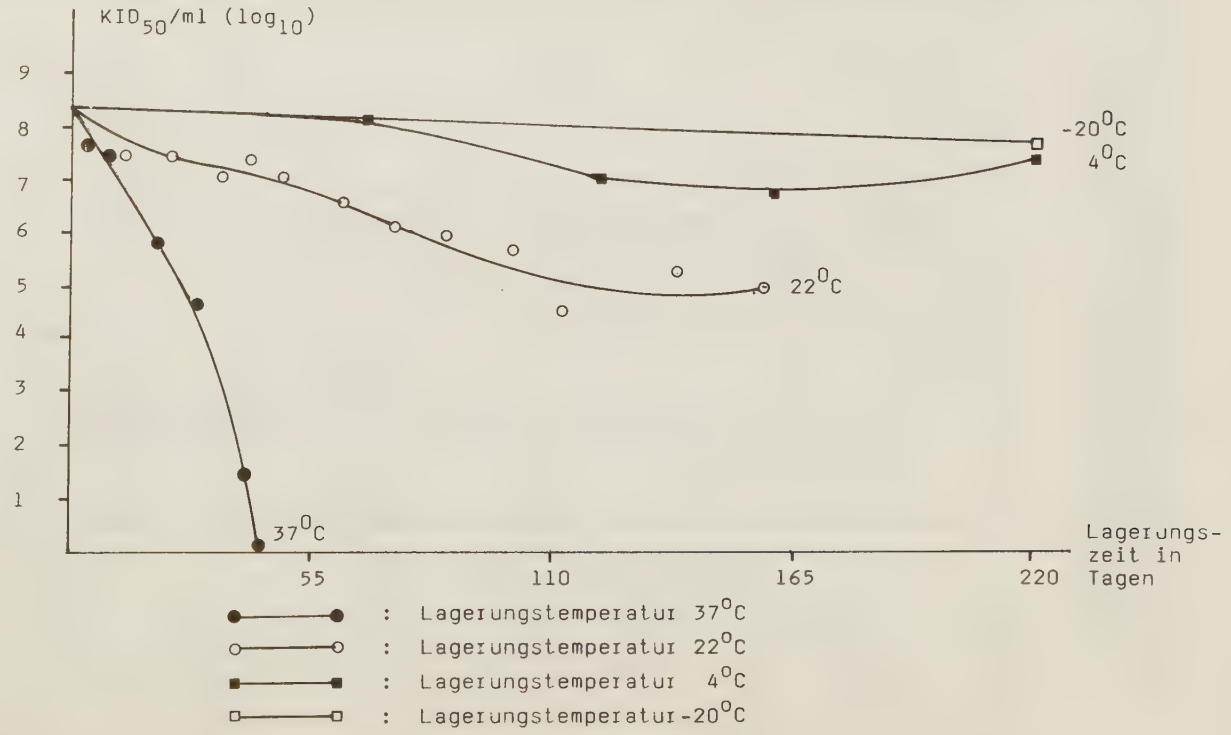
Anzahl der Affen [1]	Befund
22	ohne Befund
3	leichter Appetitverlust am 3. Tag nach der 1. Immunisierung
1	leichte Rötung um die Einstichstelle (ca. 3 mm ø) am Tag der 1. Immunisierung
1	leichte Schwellung und Verhärtung (ca. 1,5 cm ø) um die Einstichstelle am Tag der 1. Immunisierung
1	leichte Rötung und Schwellung (3-5 mm Ø) um die Einstichstelle drei Tage nach der 1. Immunisierung
1	leichter Appetitverlust am 3. Tag nach der 1. Immunisierung, leichte Blutung im After
1	leichte Rötung und Schwellung um die Einstichstelle (ca. 2 cm Ø), Stelle verhärtet einen Tag nach der 1. Immunisierung, leichte Rötung der Injektionsstelle 2 Tage nach der 1. Immunisierung, leichter Appetitverlust am 3. Tag nach der 1. Immunisierung

[1] insgesamt wurden 30 Affen immunisiert

Tab. 8: Stabilität des Vaccinia-Virus "MVA" in einer lyophilisierten Tetanus-Pocken-Kombinationsvaccine (Charge I/81)

Lagerungstemperatur	Lagerungszeit t (in Tagen)	KID_{50}/ml des Vaccinia-Virus "MVA" angegeben als Exponent von log 10 Ausgangswert bei t=0: 8,25	
		Charge I/81 lyophilisiert mit Gelatine und Glukosamin	"MVA"-Impfstoff ohne Zusätze lyophilisiert
37^0C	3	7,25	
	7	7,50	
	10	7,25	
	14	5,75	1,75
	24	4,50	
	28	1,50	
	32	≤1,50	
	35	≤1,50	
22^0C	8	7,25	
	14		6,75
	21	7,25	
	28		4,25
	30	7,00	
	41	7,25	
	51	7,00	
	63	6,75	
	73	6,25	
	83	6,00	
	93	5,75	
	113	4,75	
	134	5,25	
	163	5,00	2,25
4^0C	63	8,25	
	134	7,00	
	163	6,75	7,00
	220	7,50	
	375		7,00
-20^0C	220	7,75	

Abb. 2: Inaktivierungskurve des Vaccinia-Virus "MVA" in einer Kombinationsvaccine mit Tetanus-Toxoid bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen



D BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

In den vorliegenden Untersuchungen wurde erstmals nachgewiesen, daß eine kombinierte Impfung mit Tetanus-Toxoid und dem Vaccinia-Virus "MVA" möglich ist. Ergebnisse aus verschiedenen Versuchstiermodellen zeigten ein übereinstimmendes Immunisierungsergebnis zwischen einem Kombinationsimpfstoff gegen Pocken und Tetanus und den entsprechenden Einfachimpfstoffen. Die wenigen bisher in der Literatur beschriebenen Untersuchungen zur Entwicklung eines Kombinationsimpfstoffes gegen Tetanus und Pocken waren dagegen nicht so erfolgreich (Higy-Mandic 1965; Ikic 1969; Stein 1975). Für diesen Unterschied ist vor allem die von uns erstmals gewählte Pockenkomponente verantwortlich. Bisher wurde versucht, Tetanus-Formoltoxoid mit dem Vaccinia-Stamm "Elstree" zu kombinieren. Bei diesem Stamm ist aber eine intrakutane Applikation erforderlich, die für das Tetanus-Toxoid unüblich und, wie die bisherigen Ergebnisse zeigten, nur schlecht geeignet ist. Wir verwendeten erstmals den von Mayr entwickelten Vaccinia-Stamm "MVA", der auch intramuskulär anwendbar ist. Dieser Stamm hat außerdem den Vorteil, daß er unschädlich ist. Diesen Vorteilen steht der Nachteil gegenüber, daß für eine belastbare Immunität Revaccinationen erforderlich sind (Mayr et al. 1978, 1975). Da diese auch im Falle des Tetanus-Toxoids notwendig sind, könnte der Kombinationsimpfstoff gegen Pocken und Tetanus ohne größere Umstellung in den Impfkalender übernommen werden.

Die Verträglichkeit des Kombinationsimpfstoffes war zufriedenstellend. Die gelegentlich auftretenden kurzzeitigen Rötungen und Schwellungen an der Injektionsstelle bei den Versuchstieren sollte man im Hinblick auf eine Anwendung der Vaccine beim Menschen nicht überbewerten, da auch bei den bekannten Impfungen gelegentlich lokale Reaktionen an der Impfstelle beobachtet werden. Ob diese Reaktionen auf das Tetanus-Toxoid oder auf das Vaccinia-Virus zurückzuführen sind, kann nicht entschieden werden. Aus früheren Immunisierungsversuchen bei Affen mit Tetanus-Toxoid oder Vaccinia-Virus "MVA" wissen wir, daß beide Antigene Lokalreaktionen verursachen können (Hochstein-Mintzel et al. 1975). Da diese Impfreaktionen nur nach der Erstimpfung

auftreten, ist eine allergische Genese auszuschließen. Die von uns praktizierte intramuskuläre Applikation hat im Vergleich zur bisher bei Kombinationsvaccinen gegen Pocken und Tetanus praktizierten intrakutanen Methode den Vorteil, daß in der Muskulatur mit einer raschen Resorption des Inokulums zu rechnen ist. Dadurch wird die Gefahr von Lokalreaktionen automatisch wesentlich gemildert (Hochstein-Mintzel et al. 1975).

Die Schwierigkeiten bei der Entwicklung der Pocken-Tetanus-Vaccine ergaben sich aus der Frage der Adjuvantien, da mit dem formalininaktivierten Tetanus-Toxoid und dem attenuierten, vermehrungsfähigen Vaccinia-Virus zwei ganz unterschiedliche Antigene in bezug auf ihre Ansprüche an Adjuvantien kombiniert wurden. Das Tetanus-Toxoid benötigte z.B. keine stabilisierenden, sondern immunitätssteigernde Zusätze (z.B. Aluminiumhydroxid). Das Aluminiumhydroxid führte aber zu einer raschen Inaktivierung und damit raschem Wirksamkeitsverlust des Virusanteils und war deshalb für unsere Kombinationsvaccine ungeeignet. Für das vermehrungsfähige Vaccinia-Virus waren dagegen Stabilisatoren notwendig, die jedoch die Immunogenität des Tetanus-Toxoids nicht steigerten. Zufriedenstellend für beide Antigene wirkte sich nur die hier erstmals verwendete Adjuvansmischung von Gelatine und Glukosamin aus. Mit dieser Mischung konnte die Wirksamkeit des Tetanus-Toxoids und die Stabilität des "MVA"-Virus verbessert werden.

Die Beurteilung der Wirksamkeit der Tetanus-Komponente in der Kombinationsvaccine war relativ problemlos, da bereits bewährte Tetanus-Impfstoffe als Vergleichspräparate zur Verfügung standen, d.h. durch den Vergleich der Immunreaktion nach Impfung mit der Kombinationsvaccine mit derjenigen nach Impfung mit Tetanol^{R} war eine fundierte Aussage möglich. Für die Wirksamkeitsprüfung der Tetanus-Komponente reicht die Bestimmung des humoralen Antitoxintiters aus, da zwischen dem Infektionsschutz und dem postvaccinalen Antitoxintiter im Serum eine enge Korrelation besteht. Wir konzentrierten uns deshalb bei Tetanus auf die Bestimmung der Serumantitoxine. Hierfür bewährte sich als schnelles und gut reproduzierbares Nachweissystem der ELISA

(Fey 1977; Stiffler-Rosenberg 1977). In anderen Untersuchungen konnte eine lineare Abhängigkeit des ELISA-Titers vom Neutralisationstest nachgewiesen werden. Dadurch wird der arbeitsaufwendige Neutralisationstest am Tier nicht notwendig. Im ELISA wurde nachgewiesen, daß die Antitoxintiter nach zweimaliger Grundimmunisierung von Versuchstieren mit der Kombinationsvaccine nur unwesentlich unter den Werten des handelsüblichen Tetanus-Impfstoffes lagen und deutlich über den von der WHO geforderten Schutzschwellenwerten von 0,01 I.E..

Bei der Pocken-Komponente basiert die antivirale Immunität nicht nur ausschließlich auf humoralen, sondern auch auf den zellulären Abwehrmechanismen (Stickl et al. 1974). Die positiven Ergebnisse der serologischen Untersuchungen und des Intrakutantestes und Belastungstestes bestätigen, daß nach Immunisierung mit der Kombinationsvaccine sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunität ausgebildet wird. Dabei ergab sich in allen Testmethoden eine gute Übereinstimmung zwischen den Antikörperuntersuchungen und den Ergebnissen des Intrakutan- und Belastungstestes, so daß trotz der Zweigleisigkeit des Abwehrmechanismus den Ergebnissen der Antikörperbestimmung durchaus eine Aussagekraft zukommt.

Im Falle der Pocken-Komponente lagen die mittleren Antikörpertiter nach zweimaliger Immunisierung mit der Kombinationsvaccine über denjenigen, die nach Impfung mit dem Vaccinia-Virus allein gemessen werden konnten. Die Wirksamkeit der "MVA"-Komponente konnte somit durch Zugabe von Tetanus-Toxoid etwas gesteigert werden.
Für die Antikörperbestimmung gegen Pocken bewährte sich der Neutralisationstest besser als der Hämagglutinationshemmungstest. Die Neutralisationstiter waren deutlich höher als die Hämagglutinationstiter. Dies war aber zu erwarten, da die Hämagglutininbildung des "MVA"-Virus durch die Zellkulturpassagen reduziert wird. Erst nach mehrmaliger Immunisierung mit dem "MVA"-Virus konnten bei Versuchstieren deutliche Titer von hämagglutinationshemmenden Antikörpern nachgewiesen werden (Stickl et al. 1974).

Die Kreuzimmunität spielt eine wichtige Rolle bei der Frage der Pockenimmunität. Die Immunisierung mit nicht attenuiertem Vaccinia-Virus hat sich jahrzehntelang bei der Immunprophylaxe gegen Variola bewährt (Mayr 1976). Da in der von uns entwickelten Kombinationsvaccine gegen Tetanus und Pocken attenuiertes Vaccinia-Virus enthalten ist, war für die Bewertung der Vaccine interessant, inwieweit eine Kreuzimmunität gegen nicht attenuierte Vaccinia-Virusstämme ausgebildet wird. Sowohl in bezug auf die humorale Immunantwort als auch in bezug auf die zelluläre Immunantwort ließ sich eine Kreuzimmunität nachweisen, die praktisch genauso stark war wie die homologe Immunantwort. Im Belastungsversuch war der Vergleich zwischen homologer und heterologer Immunität nicht möglich, da der homologe "MVA" Vaccinia-Virusstamm für Mäuse avirulent ist. Die Versuche beweisen aber, daß eine "MVA"-Vaccine heterolog gegen andere Vaccinia-Virusstämme, z.B. gegen den sehr virulenten und neuropathogenen Vaccinia-Stamm "M_1" schützt.

Bei den Untersuchungen zur Haltbarkeit- bzw. Lagerungsfähigkeit der Kombinationsvaccine "Pocken-Tetanus" überprüften wir nur die Pockenkomponente, da das attenuierte Vaccinia-Virus wesentlich empfindlicher gegenüber äußeren Einflüssen ist als das Tetanus-Toxoid. Außerdem liegen über das Tetanus-Toxoid entsprechende Erfahrungen vor. Aus den Ergebnissen der Lagerungsversuche mit der Charge I/81 der Kombinationsvaccine "Pocken-Tetanus" können wir schließen, daß bei einer Lagerungstemperatur von -20°C bzw. 4°C der Kombinationsimpfstoff in lyophilisierter Form mit den Zusätzen Gelatine und Glukosamin mindestens über 8 Monate haltbar ist. Für die Bildung einer belastbaren Immunität gegen Pocken reicht die zweimalige Applikation von mindestens $10^{7,50}KID_{50}$ Vaccinia-Virus "MVA" pro Impfling aus (Mayr et al. 1975). Dieser Titer war in unseren Untersuchungen bei einer Lagerungstemperatur von -20°C und 4°C noch nach ca. 8 Monaten nachweisbar.

Mit den Untersuchungen bei Maus, Ferkel und Affe konnten wir die Wirksamkeit, Unschädlichkeit und Lagerungsfähigkeit der Kombinationsvaccine gegen Pocken und Tetanus nachweisen. Für eine er-

folgreiche Grundimmunisierung sowohl gegen Tetanus als auch gegen Pocken ist eine zweimalige intramuskuläre Applikation des Impfstoffes im Abstand von 4 bis 6 Wochen erforderlich (Mayr et al. 1975). Da die Ergebnisse bei allen Versuchstierarten ähnlich waren, ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß eine Kombinationsimpfung gegen Pocken und Tetanus mit der von uns entwickelten Kombinationsvaccine auch beim Menschen möglich ist. Man kann zumindest jetzt schon sagen, daß eine kombinierte Schutzimpfung des Menschen gegen Pocken und Tetanus keine Utopie darstellt.

E ZUSAMMENFASSUNG

In Immunisierungsversuchen bei Mäusen, Ferkeln und Affen wurde die Wirksamkeit und Unschädlichkeit einer numerisch-additiven Kombinationsvaccine gegen Tetanus und Pocken geprüft. Der Wirksamkeitsnachweis erfolgte durch die Bestimmung postvaccinaler Antikörper und im aktiven Mäuseschutztest. Die Antikörpertitrationen wurden mit dem ELISA und der indirekten Hämagglutination (Tetanus) bzw. dem Neutralisationstest und dem Hämagglutinationstest (Pocken) durchgeführt.

In der Wirksamkeit ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Kombinationsvaccine und den entsprechenden monovalenten Impfstoffen. Für die Anwendung beim Menschen wird eine Kombinationsvaccine mit 12 Lf Tetanus-Formoltoxoid, $10^{8,25}KID_{50}$ Vaccinia-Virus "MVA" und den Zusätzen Gelatine (1%) und Glukosamin (3%) empfohlen.

Die Kombinationsvaccine "Pocken-Tetanus" kann in lyophilisierter Form bei +4°C und bei -20°C mindestens 8 bis 12 Monate ohne Wirksamkeitsverlust gelagert werden.

Nach zweimaliger intramuskulärer Immunisierung von 30 Affen wurde 2 Wochen p.revacc. ein mittlerer Tetanus-Antitoxintiter von 11 I.E./ml und ein mittlerer Vaccinia-Virustiter von 1:215 (Neutralisationstest) gemessen.

Bis auf gelegentlich auftretende, kurzzeitige Lokalreaktionen an der Injektionsstelle bei Affen wurden keine Nebenreaktionen nach der intramuskulären Impfung mit der Kombinationsvaccine festgestellt.

SUMMARY

In immunization experiments using mice, piglets and monkeys harmlessness and effectiveness of a numerical additive combined vaccine against tetanus and smallpox were investigated. Effectiveness was demonstrated by means of antibody determination using post-vaccinal sera and by active mouse-protection-test. Tetanus-antitoxin was measured with ELISA and indirect hemagglutination-test, antibody level in smallpox were investigated with the neutralization-test and hemagglutination-inhibition-test.

There were no significant difference in potency between the combined vaccine and the corresponding monovalent vaccines. For human use a combined vaccine is recommended which consists of 12 Lf tetanus-toxoid and $10^{8,25}$ KID_{50} vaccinia-virus "MVA", preserved with gelatine (1%) and glukosamin (3%).

The combined vaccine "tetanus-smallpox", lyophilised, can be stored at 4°C and -20°C for at least 8 to 12 months without loss of potency.

The double intramuscular immunization of 30 monkeys stimulated, 2 weeks p. revacc., average tetanus-antitoxin titers of 11 I.E./ml and average vaccinia-titers of 1:215 (neutralization-test).

Except for occasional local reactions of short duration at the injection site of the monkeys, no side effects were observed after intramuscular vaccination with the combined vaccine.

F LITERATURVERZEICHNIS

1. Aleksandrov, N.J., N.E. Gefen, N.B. Egorova, V.N. Efremova, I.V. Vorontsov, I.V. Miroshnichenko, 1970:
Aerosol revaccination with typhoid-botulinum A and B tri-vaccine and with typhoid-tetanus-botulinum A and B tetravaccine under experimental conditions on animals.
Z.Mikrobiol.Epidemiol.Immunobiol. 47 (5), 84-89.

2. Ast, O., R. Dubrenil, V. Pavilanis and M. Guevillon, 1967:
Association of inactivated measles vaccine to DPT Vaccine; Antigenicity in Guinea Pigs.
Symp. Series immunobiol. Standard. (7), 73-80.

3. Barkin, R.M. and M.E. Pichichero, 1979:
Diphtheria-pertussis-tetanus vaccine: reactogenicity of commercial products.
Pediatrics 63 (2), 256-260.

4. Barret, C.D., I.W. Mc Lean, J.G. Molner, E.A. Timm and C.F. Weiss, 1962:
Multiple antigen for immunization of infants against poliomyelitis, diphtheria, pertussis and tetanus.
Pediatrics 30 (11) 720-735.

5. Beale, A.J. and J. Ungar, 1962:
Potency and stability of combined pertussis, diphtheria, tetanus and poliomyelitis (quadruple) vaccine.
Lancet 2, 805-808.

6. Behring-Codex, 1964:
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.

7. Bernard, J.G., L. Colobert, A. Darbon, R. Dioux, G. Doukhan, L. Girier, B. Montagnon et P. Servant, 1962:
Etude immunologique de la vaccination associée antidiphthérique, antitétanique, antityphoparatyphoidique et antipoliomyélitique.
Bull.Org.mond.Santé 26, 699-725

8. Bommeli, W., U. Kihm, J. Löhrer und H. Fey, 1980:
Die Wirksamkeit der Pferde Influenza-Impfstoffe mit Berücksichtigung des Tetanus-Toxoids der kombinierten Impfstoffe.
Schweizer Archiv f. Tierheilkunde 122 (1), 27-37.

9. Bordt, D.E., J.W. Whalen, P.A. Boyer, A.R. Pursell and F.P. Staffieri, 1960:
Poliomyelitis component in quadruple antigen.
J.Amer.med.Ass. 174 (9), 1166-1169.

10. Brouwer, R., 1976:
Vaccination of infants in their first year of life with split inactivated measles vaccine incorporated in a DPTP (inactivated) vaccine (DPTP-M), compared with live measles vaccination.
J.of Biol.Standard. 4, 13-23.

11. Brouwer, R. and H. Cohen, 1976:
Reactogenicity for infants of pertussis-vaccines, harvested by centrifugation of acid precipitation.
J.of Biol.Standard. 4, 5-12.

12. Brown, G.C., V.K. Volk, R.V. Gottshall, P.L. Kendrick and H.D. Anderson, 1964:
Responses of infants to DTP-P vaccine used in nine injection schedules.
Public Health Reports 79 (7), 585-602.

13. Butler, N.R., B.R.D. Wilson, P.F. Benson, J.A. Dudgeon, J. Ungar and A.J. Beale, 1962:
Response of Infants to Pertussis Vaccine at one week and to Poliomyelitis, Diphtheria and Tetanus Vaccine at six month.
Lancet July 21, 112-115.

14. Butler, N.R., M.A. Voyce, W.L. Burland and M.L. Hilton, 1969:
Advantages of aluminium hydroxide adsorbed combined diphtheria, tetanus and pertussis vaccines for the immunization of infants.
Brit.Med.J. 1, 663-666.

15. Cabau, N., F.M. Levy, E.H. Relyveld, R. Labusquiere, A. Poirier, P. Ravisse et L. Chambon, 1970:
Vaccination antidiphthérique-antitétanique par anatoxines adsorbées sur Ca-phosphate en deux injections a un an d'intervalle.
Ann.Inst.Pasteur 119 (5), 663-670.

16. Cameron, J., 1980:
The potency of whooping cough (Pertussis) vaccines in Canada.
J.Biol.Standard. 8, 297-302.

17. Chodnik, K.S., A.R. Watson and J.R. Hepple, 1959:
Active Immunisation of Sheep and Horses Against Tetanus with Aluminium-Hydroxide-Adsorbed Toxoid.
Vet.Rec. 71, (43), 904-908.

18. Cohen, H., B. Hofmann, R. Brouwer, A.L. van Wexel and Ch.A. Hannik, 1973:
Combined inactivated vaccines.
Symp.Series Immunobiol.Standard. 22, 133-141.

19. Davydov, J.K., 1960:
Efficacy of active combined immunization against staphylococcal infections and tetanus.
J.Microbiol.Epidem.Immunobiol. 31 (4), 27-31.

20. Dostal, V. and J. Haentzel, 1967:
Use of Combined Smallpox and Tetanus Vaccines.
Symp.Series Immunobiol.Standard. 7, 71-72.

21. Edsall, G., J.S. Altman and A.J. Gaspar, 1954:
Combined Tetanus-Diphtheria Immunization of Adults: Use of Small Dosis of Diphtheria Toxoid.
Am.J.Publ.Hlth. 44, 1537-1545.

22. Edsall, G., J.A. Mc Comb, L.H. Wetterlow and J. Ipsen, 1962:
Significance of the Loss of Potency in the Pertussis Component of Certain Lots of "Quadruple Antigen".
New Eng.J.of Med. 267 (14), 687-689.

23. Egorova, N.B., 1968:
Anaphylactic reactions and antitoxin titres in aerosol and s.c. immunization against tetanus and typhoid.
Z.Mikrobiol.Epidemiol.Immunobiol. 39 (4), 63-68.

24. Ehrengut, W., 1974:
Läßt sich die Reserve gegenüber der Pertussis-schutzimpfung begründen?
Päd.prax. 23, 3-13.

26. Enders-Ruckle, G., H. Spiess und H. Wolf, 1966:
Erste Ergebnisse mit einem 5-fach Impfstoff gegen Masern, Diphtherie, Pertussis, Tetanus und Poliomyelitis.
Dtsch.med.Wschr. 91, 575.

27. Engelhardt, H. and W. Pranter, 1967:
Experimental Studies on Combined Oedematiens (Novyi) and Tetanus Toxoids.
Symp.Series Immunobiol.Standard. 7, 211-216.

28. Feeley, J.C., G.T. Curlin, K.M.A. Aziz, G.L. Wiggins and W.L. Albritton, 1979:
Response of Children in Bangladesh to Adult Type Tetanus-Diphtherie Toxoid (Td), Administered During a Field Trial of Cholera Toxoids.
J.Biol.Standard. 7, (3), 249-252.

29. Fenner, F., 1977:
The Eradication of Smallpox.
Progr.med.Virol. 23, 4-21.

30. Fey, H. und G. Stiffler-Rosenberg, 1977:
Messung von Tetanus-Antitoxin beim Pferd mit dem ELISA.
Schweizer Archiv f. Tierheilkunde 119 (11), 437-446.

31. Fleming, D.S. and L. Greenberg, 1950:
The Use of Combined Antigens in the Immunization of Infants.
Canad.Med.Ass.J. 62, 146-148.

32. Fontanges, R., J.M. Fournier, H. Monteil, P. Darmenton et A. Gairard, 1971:
L'immunization par Aerosols. VII.Vaccination des Singes Babouins par l'Anatoxine Tétanique lyophilisée et par le Mélange a Tétanique à Diphthérique.
Ann.Inst.Pasteur 120, 831-848.

33. Frerichs, G.N. and A.K. Gray, 1973:
Immune response of rabbits to a multicomponent clostridial vaccine.
J.of Biol.Standard. 1, 33-36.

34. Frerichs, G.N. and A.K. Gray, 1975:
The relation between the rabbit potency test and the response of sheep to sheep clostridial vaccines.
Res.Vet.Sc. 18, 70-75.

35. Frühwein, N. und V. Hochstein-Mintzel, 1980
Bestimmung von Tetanus-Antikörpern im menschlichen Serum mit dem ELISA-Test (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay)
Ärztl.Lab. 26, 271-274.

36. Gateff, C., E.H. Relyveld, G.Le Gonidec, J. Vincent, R. Labusquière, M.Mc Bean, D. Monchicouri et L. Chambon, 1973:
Étude d'une nouvelle Association Vaccinale Quintuple.
Ann.Microbiol.(Inst.Pasteur) 124 B, 387-409.

37. Gray, A.K., 1976:
The use of a multicomponent standard for clostridial vaccines.
Develop.biol.Standard. 32, 245-250.

38. Greenberg, L. and D.S. Fleming, 1950:
Experience with Oral Immuniz ation against Diphtheria and Tetanus in Human Subjects.
Canad.J.of Publ.Hlth. 41, 445-451.

39. Griffith, A.H., 1979:
The Role of Immunization in the Control of Diphtheria.
Develop.biol.Standard. 43, 3-13.

40. Hegyessy, G., S. Bozsoky and E. Schulek, 1956:
A study of the immunity against tetanus toxin following the use of a combined typhoid-tetanus vaccine.
Brit.J.exp.Path. 37, 300-305.

41. Hemert, van, P.A., 1969:
Specific Properties of Acid Precipitated Pertussis Vaccine.
Progr.Immunobiol.Standard, 3, 297-301.

42. Henigst, W., 1963:
Bildung von neutralisierenden Antikörpern nach Verabreichung eines kombinierten Impfstoffes mit Poliomyelitis-Diphtherie- und Tetanusanteil.
Münch.med.Wschr. 105, 1205-1209.

43. Henigst, W. und F. Müller, 1965:
Antikörperbildung nach drei 4-fach-Impfstoff-Injektionen und nachfolgender trivaltenter Polio-Schluckimpfung.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 90, 1502.

44. Henigst, W. und F. Müller, 1966:
Über die Wirksamkeit von Masernimpfstoff bei Säuglingen und Kleinkindern.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 91, 1773.

45. Hennessen, W., 1961:
Experimentelle Untersuchungen über die Konkurrenz der Antigene.
Zschr.Hyg. 148, 61.

46. Hennessen, W. and R. Mauler, 1961:
The antigenic potency of quadruple vaccine containing killed poliovirus.
Dt.med.Wschr. 86, 861.

47. Hennessen, W., 1965:
Allgemeines über kombinierte Impfstoffe
in: Handbuch der Schutzimpfungen von A. Herrlich
Springer-Verlag, Berlin.

48. Hepple, J.R. and D.J. Jull, 1960:
Simultaneous vaccination of sheep against pulpy kidney disease, braxy, blackleg and tetanus.
Vet.Rec. 72, 766.

49. Higy-Mandic, L., 1965:
The influence of adding the vaccinia component to triple prophylactic on the immunogenic potency of diphtheria, tetanus and pertussis antigens.
Radovi Immunoloskog Zadova, Zagrebu III u. IV, 153-165; Zit.nach Stein S. (99).

50. Hochstein-Mintzel, V., H.Ch. Huber und H. Stickl, 1972:
Virulenz und Immunogenität eines modifizierten Vaccinia-Virus (Stamm MVA).
Z.Immun.-Forsch. 144, 140-156.

51. Hochstein-Mintzel, V., T. Hänichen, H.Ch. Huber und H. Stickl, 1975:
Vaccinia-variolaprotektive Wirkung des modifizierten Vaccinia-Stammes MVA bei intramuskulärer Immunisierung.
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A 230, 283-297.

52. Hooker, J.M., 1981:
A laboratory study of the toxicity of some diphtheria-tetanus-pertussis-vaccines.
J.of Biol.Standard. 9, 493-505.

53. Ikić, D., 1958:
Post-inoculation reactions caused by tetanus P.T.A.P. prophylactic with and without addition of typhoid and paratyphoid germs.
Acta med.jugosl. 12, 103-108.

54. Ikič, D., 1969:
Simultanous administration of smallpox and diphtheria, tetanus and pertussis vaccine. Proceedings Symposium on Smallpox, Zagreb 2.u.3. Sept. 1969; Zit. nach Stein S. (99).

55. Immunization Practices Advisory Committee, Centers for Disease Control, Atllanta, Georgia, 1981: Diphtheria, Tetanus and Pertussis: Guidelines for Vaccine Prophylaxis and other Preventive Measures.
Annals of int.Med. 95, 723-728.

56. Jaeger, O. and R. Barth, 1972:
Tierexperimentelle Erfahrungen mit einem Prevacun/Tetanus-Kombinationsimpfstoff.
Blaue Hefte 48, 381-386.

57. Katitch, R., Z. Voukitchevitch, R. Stephanovitch et G. Gadjanski, 1970:
Influence du mode d'administration de l'antigène sur le titre des antitoxines tétanique, oedématiens, septique, anti ß et anti ε de welchia agni et sur la distribution des protéines dans le sérum sanguin.
Revue d'Immunologie 34 (3), 127-139.

58. Katitch, R., Z. Voukitchevitch, L. Cvetkovitch, S. Jatchimovitch et B. Tchavitch, 1971:
Mode d'emploi du tétrachlorure de carbon en cas de protection simultanée du Mouton contre le affections anaérobies et la distomatose.
Recueil de Méd.Vét. 147, 627-636.

59. Kerry, J.B. and A. Thomson, 1969:
A note on the Intraperitoneal Injection of Sheep with Oil Adjuvant Vaccines.
Vet.Rec. 85, 84-85.

60. Kerry, J.B. and C.R. Craig, 1979:
Field Studies in Sheep with Multicomponent Clostridial Vaccines.
Vet.Rec. 105, 551-554.

61. Klose, F., 1970:
Aktive und passive Schutzimpfung gegen Wundstarrkrampf und Clostr.-novyi-Gasödem.
Dtsch.med.Wschr. 95, 510-513.

62. Knight, P.A. and R.N. Lucken, 1976:
The Assay of Clostridial Vaccines in Mice.
Develop.biol.Standard. 32, 251-257.

63. Ladnyi, I.D. and J.G. Breman, 1978:
Smallpox eradication: Progress and Problems.
Develop.biol.Standard. 41, 281-290.

64. Larina, J.A., 1969:
Die Prophylaxe von Anaerobierinfektionen im Tierversuch an Affen.
Z.Mikrobiol.Epidemiol.Immunobiol. 43 (1), 118-123.

65. Lepik, B.K., 1963:
Experimental study of associated immunization against Staphylococcus-infection, Tetanus, Typhoid and Paratyphoid B.
Z.Mikrobiol.Epidemiol.Immunobiol. 40 (11) 118-122.

66. Lévine, L., J. Ipsen and J.A. Mc Comb, 1961:
Adult Immunization: Preparation and evaluation of combined fluid tetanus and diphtheria toxoids for adult use.
Amer.J.Hyg. 73, 20-35.

67. List, P.H. und L. Hörhammer, 1971:
Mayers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis
VII. Band.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

68. Maeve, M. and I. Petersen, 1982:
The durability of inaktivated Poliovirus-
vaccine. Studies on the stability of potency
in vivo and in vitro.
J. of Biol. Standard. 10, 261-268.

69. Mahieu, J.M., A.S. Muller, A.M. Voorhoeve and H. Dikken, 1978:
Pertussis in a rural area of Kenya:
epidemiology and a preliminary report on a
vaccine trial.
Bull. of the World Hlth.Organ. 56, 773-780.

70. Mangay-Angara, A., L. Fulgencio, G. Casabal, L. Gudani, J. Sumpaico, A. Ocampo, J. Nagel, A.M. Hagenaars, P.A. von Hemert and H. Cohen, 1980:
A two-dose schedule for immunization of infants
against diphtheria, pertussis and tetanus.
J. of Biol. Standard. 8, 87-96.

71. Mayr, A., V. Hochstein-Mintzel und H. Stickl, 1975:
Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des
attenuierten Vaccinia-Stammes MVA.
Infection 3, (1), 6-14.

72. Mayr, A., 1976:
TC-Marker des attenuierten Vaccinia-Impfstammes
"MVA" in menschlichen Zellkulturen.
Zbl.Vet.Med.B, 23, 417-430.

73. Mayr, A., H. Stickl, K.H. Müller, K. Danner und H. Singer, 1978:
Der Pockenimpfstamm MVA: Marker, genetische Struktur, Erfahrungen mit der parenteralen Schutzimpfung und Verhalten im abwehrgeschwächten Organismus.
Zbl.Bakt.Hyg.,I.Abt.Orig.B 167, 375-390.

74. Mayr, A. and K. Danner, 1978:
Vaccination against pox disease under immunosuppressive conditions.
Develop.biol.Standard. 41, 225-234.

75. Mayr, A. und K. Danner, 1978:
Aufhebung der Pflichtimpfung gegen Pocken.
Münch.med.Wschr. 121 (50), 1675-1678.

76. Mayr, A. und K. Danner, 1979:
Bedeutung von Tierpocken für den Menschen nach Aufhebung der Pflichtimpfung gegen Pocken.
Berl.Münch.tierärztl.Wschr. 92, 251-256.

77. Mayr, A., 1980:
New emerging viral zoonoses.
Vet.Rec. 106 (24), 503-506.

78. Mayser, P., 1981:
Pertussis: gegen Keuchhusten impfen?
Gelbe Hefte 3/1981.

79. Mc Comb, J.A. and L. Levine, 1961:
Adult Immunization: II. Dosage Reduction as a Solution to increasing Reactions to Tetanus Toxoids.
New Engl.J.Med. 265 (7), 1152-1153.

80. Müller, I. und M. Haupt, 1979:
Impfkomplikationen nach Dreifachimpfung.
Kinderärztl.Praxis 5, 269-275.

81. Oxer, D.T., D.W. Minty and C.E. Liefman, 1971:
Vaccination Trials in Sheep with Clostridial Vaccines with Special Reference to passively acquired Cl. welchii Type D Antitoxin in Lambs.
Austr.Vet.J. 47, 134-140

82. Penfold, W.J., J.C. Tolhurst and D. Wilson, 1941:
Active Immunization against Gasgangrene and Tetanus.
J.Path.Bact. 52, 187-201.

83. Pilars, C.E. und H. Spiess, 1981:
Diphtherie- und Tetanusantikörper bei Kindern und jungen Erwachsenen.
Dtsch.med.Wschr. 106 (41), 1341.

84. Pittmann, M., 1962:
Instability of Pertussis Vaccine Component in Quadruple Antigen Vaccine.
J.Amer.med.Ass. 181 (1), 25-30.

85. Rainsford, S.G., 1942:
The preservation of Vi antigen in T.A.B.C. Vaccine with a note on combined active immunization with T.A.B.C. vaccine in tetanus formol toxoid.
J.Hyg. 42, 297-322.

86. Ramon, G. et Ch. Zoeller, 1926:
Les "vaccins associés" par union d'une anatoxine et d'un vaccin microbien (TAB) ou par mélanges d'anatoxines.
C.R.Soc.Biol. 94, 106-109.

87. Ramon, G., A. Saenz et R. Richou, 1940:
Le dévelopment et les fluctuations du taux des antitoxines diphthérique, tétanique et staphylococcique chez les animaux immunisés soit avec chacune des antitoxines spécifiques, soit avec le mélange des trois anatoxines.
C.R.Soc.Biol. 133, 184-188.

88. Regamey, R.H., 1944:
L'immunité antitétanique conférée par le vaccin T.P.T.
Schweizerische med. Wschr. 24 (9), 230-234.

89. Regamey, R.H., 1965:
Die Tetanusschutzimpfung
in: Handbuch der Schutzimpfungen v. A. Herrlich
Springer-Verlag, Berlin.

90. Relyveld, E.H., E. Henocq, B. Bizzini, 1979:
Studies on untoward reactions to diphtheria and tetanus toxoids.
Develop.biol.Standard. 43, 33-37.

91. Ruben, F.L., J. Nagel and P. Fireman, 1978:
Antitoxin responses in the elderly to tetanus-diphtheria (Td) immunization.
Amer.J.Epidemiol. 108 (2), 145-149.

92. Schmidt, G., 1967:
Combined Influenza and Tetanus Antigens.
Symp.Series Immunobiol.Standard. 7, 129-132.

93. Schuchardt, L.F., J. Munoz and W.F. Verwey, 1960:
Studies on a combined diphtheria-pertussis-tetanus-poliomyelitis-vaccine.
Amer.J.Publ.Hlth. 50, 321-328.

94. Schweier, P., 1980:
Die Kontroverse um die Keuchhustenimpfung.
Pädiatr. Praxis 23, 1-2.

95. Sellers, A.H., D.G. Caldblick, G.G. Waters and M.J. Macquarrie, 1951:
Further Studies on the Use of a Combined Antigen TABT-D.
Canad.J.Publ.Hlth. 42, 269-274.

96. Singer, H., 1978:
Einfluß einer Immunsuppression auf eine experimentelle Pockeninfektion mit verschiedenen Vaccinia-Stämmen.
Inaug.Diss., Vet.Med., München.

97. Sitzmann, F.C., 1981:
Impfungen im Kindesalter.
Fortschr. der Med. 99 (35), 1373-1420.

98. Smith, J.W.G., 1969:
Diphtheria and Tetanus Toxoids.
Brit.Med.Bull. 25, 177-182.

99. Stein, S., 1975:
Kann man die Tetanusschutzimpfung mit der gesetzlichen Pockenschutzimpfung kombinieren.
Inaug.Diss. Techn.Uni.München.

100. Sterne, M., I. Batty and A. Thomson, 1962:
Immunization of Sheep with Multi-Component Clostridial Vaccines.
Vet.Rec. 74 (34), 909-913.

101. Stickl, H., V. Hochstein-Mintzel, A. Mayr, H.Chr. Huber, H. Schäfer und A. Holzner, 1974:
MVA-Stufenimpfung gegen Pocken.
Dtsch.med.Wschr. 47, 2386-2392.

102. Stiffler-Rosenberg, G. und H. Fey, 1977:
Messung von Tetanus-Antitoxin mit dem Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
Schweiz.med.Wschr. 107, 1101-1104.

103. Ström, J., 1967:
Further Experience of Reactions especially of a Cerebral Nature, in Conjunction with Triple Vaccination. A Study on Vaccinations in Schweden 1959-1965.
Brit.Med.J. 4, 320-323.

104. Thomson, R.O., I. Batty, A. Thomson, J.B. Kerry, H.B.G. Epps and W.H. Foster, 1969:
The Immunogenicity of a Multicomponent Clostridial Oil Emulsion Vaccine in Sheep.
Vet.Rec. 85, 81-84.

105. Thomson, R.O. and P.A. Knight, 1976:
The relative Potency of an Oily Adjuvant Multicomponent Vaccine in Laboratory Animals and Sheep.
Develop.Biol.Standard. 32, 265-269.

106. Titarenko, I.F., 1962:
Experimentelle Beobachtungen bei Gruppen-impfungen mit Toxoid-Aerosolen (Tetanus und Staphylokokken).
Z.Mikrobiol.Epidemiol.Immunobiol. 33 (2), 8-14.

107. Udovicić, I., 1979:
Comparative Study of Immune Response in Rabbits to the Use of some Clostridial Toxoids and their Mixture.
Vet.Archiv 49 (5), 239-250.

108. Ugleva, A.I., I.M. Khanstova and V.O. Roshdestvenskaya, 1960:
Immunization against wound infektions with tetravalent toxoid.
Z.Mikrobiol.Epidemiol.Immunobiol. 31 (8), 75-79.

109. Valette, L. and H.G. Peterman, 1980:
Combined vaccines
in: Handbuch der bakt. Infektionen bei Tieren
Band II, H. Blobel und T. Schließer,
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York.

110. Vlasova, E.V. und I.A. Larina, 1969:
Immunisierung gegen Gasödemerkrankung und Tetanus mit Sextatoxoid.
Z.Mikrobiol.Epidemiol.Immunobiol. 46 (7), 113-116.

111. Vogt, D. und E. Schaudig, 1960:
Erfahrungen mit einem Kombinationsimpfstoff gegen Poliomyelitis, Diphtherie und Tetanus.
Münch.med.Wschr. 102, 1084-1087.

112. Volk, V.K., F.H. Top and W.E. Bunney, 1953:
Observations on the Effectiveness of Various Scarlet Fever Antigens used in Combinations with other Antigens in multiple Antigen Preparations.
Amer.J.of Publ.Hlth. 43 (7), 833-839.

113. Volk, VK., F.H. Top and W.E. Bunney, 1953:
Reinoculation with multiple antigen preparations of free living children previously inoculated with multiple antigen preparations.
Amer.J.of Publ.Hlth. 43 (7), 821-832.

114. Volk, V.K., R.Y. Gottshall, H.D. Anderson, F.H. Top, W.E. Bunney and R.E. Serfling, 1962:
Antigenic response to booster dose of diphtheria and tetanus toxoids, 7 to 13 years after primary inoculation of noninstitutionalized children.
Publ.Hlth.Rep. 77 (3), 185-194.

115. Volk, V.K., R.Y. Gottshall, H.D. Anderson, F.H. Top, W.E. Bunney and F. Angela, 1963:
Response to two small doses of tetanus toxoids singly or combined as DT or DTP.
Publ.Hlth.Rep. 78, 264-266.

116. Vygodcikov, G.V., V.D. Gekker, I.A. Larina, N.S. Sergeva, A.A. Vorobiev and R.A. Sallykov, 1963:
Principles of production of associated vaccines against anaerobic and intestinal infections.
Z.Mikrobiol.Epidemiol.Immunobiol. 40 (3), 9-14.

117. Zwisler, O. und H. Ronneberger, 1978:
Oral Immunization of dogs against Tetanus, Diphtheria and Pertussis.
Develop.biol.Standard. 41, 39-43.

Herrn Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr danke ich vielmals für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. habil G. Baljer möchte ich mich herzlich bedanken für die wissenschaftliche Betreuung und die großzügige Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit. Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern in seinem Labor für ihre stets bereitwillige Hilfe.

Außerdem gilt mein Dank der Fa. Huntingdon, Münster, die es mir ermöglichte , die Immunisierungsversuche an Affen durchzuführen.

G LEBENSLAUF

Geboren:	am 29. Oktober 1950 in München
Eltern:	Rudolf Wagner, Ingenieur Gertrud Müller, geb. Endres
Schulbesuch:	1957-1963 Volksschule, München 1963-1967 Realschule, München 1967 Mittlere Reife
Berufsausbildung:	1967-1969 an der Bayerischen Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung, Oberschleißheim bei München, 1969 Abschluß mit der staatlichen Prüfung f. vet.med.techn. Assistentinnen
Tätigkeit als vet.-med.techn. Assistentin:	1969-1970 am Institut für Med. Mikrobiologie der Tierärztl. Fakultät der Universität München, Abt. Bakteriologie, 1971-1974 bei der Gesellschaft für techn. Zusammenarbeit (GTZ), Frankfurt, am Zentralen Vet. Forschungsinstitut in Dar-es-Salaam, Tanzania, 1974-1976 am Institut für vergleichende Tropenmedizin der Universität München, Abt. Protozoologie
Abitur:	von 1974-1976 Vorbereitung, am 2. Juni Prüfung für die Zulassung zum Hochschulstudium ohne Reifezeugnis in Gießen
Studium:	1976-1981 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, Fachbereich Tiermedizin
Staatsexamen:	17. November 1981
Bestallung:	10. Dezember 1981
Tierärztliche Tätigkeit:	seit 1982 am Institut für Med. Mikrobiologie der Tierärztl. Fakultät der Universität München als wissenschaftliche Mitarbeiterin